

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет дизайна и технологии»

На правах рукописи

Бычук Мария Александровна

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ  
ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ПОЛИ- $\epsilon$ -КАПРОЛАКТОНА**

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка  
полимеров и композитов

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель:  
Доктор химических наук, профессор  
Кильдеева Н.Р.

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ:

Введение	5
<b>1. Литературный обзор</b>	<b>10</b>
1.1 Характеристика биоразлагаемых полиэфиров	10
1.1.1 Полигидроксиалканоаты. Полигидроксibuтират	14
1.1.2 Поликапролактон	18
1.2 Методы получения полигидроксibuтирата и поликапролактона	24
1.2.1 Получение и выделение полигидроксibuтирата	24
1.2.2 Синтез поликапролактона	31
1.3 Полимерные материалы медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полиэфиров, и методы их получения	33
1.3.1 Материалы медико-биологического назначения на основе полигидроксibuтирата	40
1.3.2 Материалы медико-биологического назначения на основе поликапролактона	44
1.3.3 Методы получения пористых материалов для биотехнологии и тканевой инженерии	46
1.3.4 Получение материалов из смесей биodeградируемых полимеров	52
<b>2. Результаты и их обсуждение</b>	<b>58</b>
2.1 Изучение полимерных систем на основе смеси полигидроксibuтирата и поликапролактона	58
2.1.1 Анализ совместимости полигидроксibuтирата и поликапролактона	59
2.1.2 Изучение вязкости разбавленных растворов ПГБ и ПКЛ	61
2.1.3 Реологические свойства растворов ПГБ и смешанных растворов ПГБ и ПКЛ	64
2.1.4 Фазовые равновесия в растворах ПГБ и ПКЛ в хлороформе	67
2.2 Получение и исследование пленок из смеси полигидроксibuтирата и поликапролактона.	70
2.2.1 Изучение морфологии пленок из ПГБ и ПКЛ	70
2.2.2 Теплофизические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ	74

2.2.3	Термомеханические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ	79
2.2.4	Физико-механические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ	82
2.2.5	Изучение надмолекулярной структуры пленок, полученных из смешанных растворов ПГБ и ПКЛ	84
2.2.6	Особенности формирования градиентного состава пленок, полученных из смешанных растворов полимеров	87
2.2.7	Изучение кинетики биodeградации биологически активных пленок на основе полигидроксibuтирата и поликапролактона	95
2.3	Получение биodeградируемых пористых полимерных матриц методом электроформования	99
2.4	Разработка высокопористых биodeградируемых пленочных материалов с комплексным биологическим действием	105
2.4.1	Изучение паропроницаемости пленок из полимерных смесей ПГБ и ПКЛ	106
2.4.2	Включение протеолитического фермента трипсина в структуру пленок из ПГБ и ПКЛ	108
2.4.3	Изучение процесса получения и свойств пленок с антимикробной и протеолитической активностью путем формования из эмульсий	112
<b>3.</b>	<b>Методическая часть</b>	<b>119</b>
3.1	Характеристика сырья и реактивов	119
3.2	Приготовление растворов полимеров	120
3.3	Определение вязкости разбавленных растворов полимеров	120
3.4	Формование пленок	121
3.5	Электроформование	122
3.6	Приготовление растворов хитозана	122
3.7	Построение фазовой диаграммы трехкомпонентной системы ПГБ – ПКЛ - хлороформ	122
3.8	Изучение морфологии пленочных образцов методом электронной микроскопии	123
3.9	Дифференциальная сканирующая калориметрия	123

3.10 Изучение кинетики испарения растворителя и расчет коэффициента диффузии	123
3.11 Изучение кинетики деградации пленок на основе ПГБ, ПКЛ и смеси состава 50:50	124
3.12 Приготовление трис – HCl буфера	124
3.13 Анализ активности нативного трипсина спектрофотометрическим методом	124
3.14 Анализ активности иммобилизованного трипсина	125
3.15 Изучение кинетики выделения трипсина из пленок в физиологический раствор	125
3.16 Изучение кинетики высвобождения из пленок антимикробных веществ	125
3.17 Определение антимикробной активности	126
3.18 Получение формовочных эмульсий	126
3.19 Изучение паропроницаемости плёнок	126
3.20 ИК-Спектроскопия, методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения	126
3.21 Динамо-механический анализ	126
3.22 Определение деформационно-прочностных характеристик пленок	127
<b>4. Выводы</b>	128
Список сокращений	129
Список литературы	130
Приложения	

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Биodeградируемые полиэфиры (полилактид, полигликолид, поли-ε-капролактон, полигидроксиалканоаты), сочетают в себе преимущества природных и синтетических полимеров. Обладая биосовместимостью и биodeградируемостью, свойственным биополимерам, они, как и многотоннажные синтетические полимеры, термопластичны и способны к переработке в изделия, как из расплава, так и из раствора.

Существует два основных направления разработок в области биоразлагаемых полимеров: создание экологичных форм упаковочных материалов и получение биосовместимых материалов для новейших медицинских технологий. Работы последних десятилетий, направлены на создание нового поколения изделий медицинского назначения: рассасывающихся шовных нитей, раневых покрытий, дифференцированных в зависимости от типа раны и фазы раневого процесса, 3d-матриц для тканевой инженерии, полимерных имплантатов, систем контролируемого выделения лекарственных соединений.

Полиэфир микробиологического происхождения поли-3-гидроксибутират (ПГБ) и наиболее доступный из синтетических биodeградируемых полиэфиров поли-ε-капролактон (ПКЛ) биосовместимы, они длительно сохраняют эксплуатационные свойства, но способны деструктурировать в природных условиях и в живых организмах до естественных метаболитов. Это создает возможность для разработки на их основе материалов, контактирующих с живыми тканями, однако каждая конкретная область использования требует от полимерного изделия заданного комплекса свойств. Создание композитов биodeградируемых полимеров значительно расширяет возможности применения полимерных систем на основе ПГБ и ПКЛ.

Эффективным способом регулирования надмолекулярной, морфологической и пористой структуры пленочных материалов является формирование композиционных пленок из смешанных растворов полимеров. Учитывая, что структурные особенности полимерных материалов во многом определяют их потребительские свойства и перспективы использования в той или иной области медицины или фармакологии, установление взаимосвязи между

составом формовочных композиций, морфологией и свойствами пленок на основе ПГБ и ПКЛ является важной научной задачей и основой выбора параметров технологического процесса получения полимерного материала.

Высокая актуальность исследования полимерных композиций ПГБ и ПКЛ как основы для разработки биodeградируемых материалов медико-биологического назначения определяется их доступностью, способностью к ферментативной гидролитической деструкции в живых организмах, отличными пленкообразующими свойствами, наличием общих растворителей, что позволит путем варьирования состава получить материалы с заданной структурой и эксплуатационными характеристиками.

**Цель работы** заключалась в разработке композиционных пленок медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полимеров ПГБ и ПКЛ и выявлении особенностей формирования их надмолекулярной и пористой структуры

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **научные задачи:**

- изучить свойства растворов ПГБ и ПКЛ в общих растворителях;
- изучить фазовые равновесия в трехкомпонентной системе полимер-полимер-растворитель;
- исследовать закономерности структурообразования в смешанных растворах ПГБ и ПКЛ в процессе испарения растворителя и структуру полученных композиционных пленок;
- изучить теплофизические и физико-механические свойства композиционных пленок на основе ПГБ и ПКЛ;
- разработать методику включения в структуру пленок из ПГБ и ПКЛ биологически активных соединений (БАС) и определить способы регулирования скорости их высвобождения из полимерного носителя;
- установить технологические параметры процесса получения биологически-активных пленочных раневых покрытий на основе ПГБ и ПКЛ.

**Научная новизна.** В работе впервые:

1. На основании изучения фазовых равновесий в трехкомпонентной системе ПГБ – ПКЛ – хлороформ определена необходимая для переработки из растворов область составов, в которой исследуемая система гомогенна: ПГБ и ПКЛ в области концентраций 2-4% образуют прозрачные растворы во всем диапазоне составов, а в отсутствие растворителя демонстрируют совместимость только в аморфных областях полимеров.

2. Установлено, что путь фигуративной точки в процессе испарения растворителя и кристаллизации ПГБ из тонкого слоя раствора полимеров определяет особенности надмолекулярной и пористой структуры пленок с различным соотношением ПГБ и ПКЛ - формирование пористой структуры или структуры матрица-включение, характер и размер пор, степень кристалличности.

3. Показано взаимное влияние полимеров в процессе кристаллизации из растворов: в присутствии поликапролактона наблюдается изменение соотношения разных кристаллических фаз полигидроксибутирата, а с увеличением содержания ПГБ происходит снижение на  $6,3^{\circ}\text{C}$   $T_{\text{пл}}$  ПКЛ, обусловленное интенсификацией процесса кристаллизации ПКЛ в присутствии ПГБ.

4. Методом ИК-МНПВО обнаружено, что пленки из смеси ПГБ и ПКЛ имеют градиентный состав: пленка обогащена на воздушной поверхности ПГБ, а на стороне, контактирующей со стеклом, - ПКЛ. Показано, что возможными причинами изменения состава пленки является градиент скоростей испарения растворителя за счет разного диффузионного пути молекул растворителя из глубины слоя формовочного раствора к поверхности, а также разная скорость кристаллизации полимеров.

5. Установлено, что механические свойства пленки, полученной из раствора смеси полимеров не определяются правилом аддитивности: значения модуля Юнга ( $E$ ) пленок из ПКЛ и ПГБ (50:50) составляют 200 и 220 МПа соответственно (для пленок из ПГБ  $E=1200$  МПа). Этот факт является следствием выявленных особенностей структурообразования в процессе испарения растворителя из смешанного раствора полимеров этого состава.

6. Обнаружено что содержащая трипсин высокопористая пленка ПГБ-ПКЛ состава 50:50, не обеспечивает ожидаемый интенсивный массоперенос, а

напротив, характеризуется пролонгированным высвобождением фермента, вероятно, вследствие адсорбции амфифильных молекул белка из водных растворов на развитой внутренней поверхности гидрофобных полимеров.

**Теоретическая значимость работы.** Установленные закономерности фазового разделения и структурообразования в смешанных растворах ПКЛ и ПГБ - биodeградируемых полиэфиров, различающихся по скорости кристаллизации и значению модуля упругости, определяют особенности надмолекулярной структуры и морфологии полимерных материалов, полученных на их основе: формирование пористой структуры пленок, их градиентный состав, бимодальное распределение по толщине волокон, полученных методом электроформования.

Установленный факт формирования градиентного состава пленок, полученных путем испарения растворителя из смешанного раствора ПКЛ и ПГБ, позволяет предположить такую возможность при формовании пленок по сухому способу из смешанных растворов других полимерных пар.

**Практическая значимость работы.** Разработаны и оптимизированы составы формовочных композиций для получения высокопористых биodeградируемых пленок на основе ПГБ и ПКЛ, содержащих протеолитический фермент и антимикробное вещество. Созданы новые материалы, перспективные для использования в медицине (раневые покрытия, системы с контролируемым выделением лекарственных соединений) и тканевой инженерии (матрицы для выращивания клеток). Показан способ регулирования паропроницаемости и кинетических характеристик процесса выделения белка и антимикробных веществ из биodeградируемых пленок. Проведены санитарно-химические и токсикологические испытания опытных образцов биологически активных пленок, показано, что полученные материалы нетоксичны и отвечают требованиям, предъявляемым к медицинским покрытиям на раны.

Результаты диссертационной работы используются при реализации в МГУДТ магистерской программы «Полимерные материалы медико-биологического назначения» по направлению магистратуры 18.04.01 – Химическая технология. В соавторстве издано учебное пособие «Биodeградируемые полимеры и их использование в медицине».



**Достоверность результатов проведенных исследований** определяется использованием современных взаимодополняющих химических и физико-химических методов исследования (построение фазовых диаграмм, реологические исследования, электронная микроскопия, ИК - и УФ-спектроскопия, термомеханические, физико-механические и теплофизические исследования, изучение антимикробной и ферментативной активности) и проведением испытаний разработанных пленочных раневых покрытий на соответствие заявленным показателям сторонними организациями.

**Апробация результатов.** Основные результаты работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в частности на: XII Всероссийской конференция «Структура и динамика молекулярных систем» (Йошкар-Ола, 2005), VII Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации» (Иваново, 2012), IV Всероссийской конференции по химической технологии ХТ'12 (Москва, 2012), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», «Ломоносов-2013» и «Ломоносов-2014» (Москва, 2012, 2013, 2014), V Всероссийской научной конференции «Физикохимия процессов переработки полимеров» (Иваново, 2013), VIII Всероссийской школе-конференции молодых ученых "Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем" (Иваново, 2013), Шестой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014» (Москва, 2014), Международной научной конференции "Композиционные и наноструктурные материалы" (Санкт-Петербург, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 в научных журналах из перечня ВАК, издано 1 учебное пособие.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, методической части, выводов, списка цитируемой литературы из 214 ссылок. Работа содержит 16 таблиц, 67 рисунков и приложения на 16 страницах.

## 1. Литературный обзор

### 1.1 Характеристика биоразлагаемых полиэфиров

Мировая промышленность в настоящее время это огромная энергоемкая система, которая потребляет не возобновляемые ресурсы, миллионами тонн вырабатывает побочные продукты, которые необходимо утилизировать или разрабатывать сопутствующие производства для их превращения в востребованный продукт.

Объем производства пластиков за последние семь лет вырос с 140 до 300 млн. тонн в год [1,2]. В передовых странах объем полимерных материалов подвергаемых вторичной переработке достигает 20%, а значит более 80% производимых полимерных материалов, через несколько месяцев переходит в разряд отходов, устойчивых к воздействию природной среды.

В сложившейся ситуации, биополимеры представляются истинными

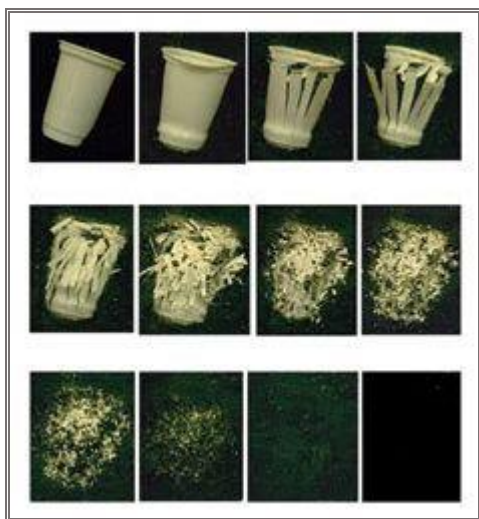


Рисунок 1 - Разложение одноразового стаканчика из биоразлагаемого синтетического полимера – полимолочной кислоты (рисунок взят с ресурса <http://www.biopolymers.ru>)

«материалами будущего», вестниками нового времени, шагом к новому миру, где человечество не паразитирует на планете, а существует в гармонии с природой. Биополимеры сходные по свойствам с традиционными полимерами и вместе с тем подверженные биодegradации, не будут десятилетиями лежать на свалках, выделяя токсичные продукты распада [2,3].

Многие из этих полимеров встречаются в природе в составе живых организмов [4] или могут быть получены

синтетическим путем из возобновляемого сырья.

Существует несколько основных направлений развития технологии биополимеров. В первую очередь, это упаковочные материалы. Второе направление развития биополимеров – получение биосовместимых и биодegradируемых материалов для новейших медицинских технологий.

Природные полимеры, помимо высокой степени биосовместимости с организмом, являются высокоэффективными биостимуляторами, то есть активируют защитные механизмы организма [5]. На их основе разрабатываются такие изделия как, системы контролируемого высвобождения лекарственных соединений, шовные нити, эндопротезы, раневые повязки, матриксы для тканевой инженерии и т.д. [6]. Эти изделия находят применение в хирургии, косметологии, травматологии, стоматологии, онкологии и во многих других отраслях медицины. Полимеры этого типа используют и в фармакологии для создания лекарств пролонгированного действия. С каждым годом ассортимент таких изделий все более расширяется. Область применения биodeградируемых материалов определяет направление разработок полимеров с нужным комплексом свойств[6].

Для замены традиционных «нефтяных» пластиков требуются материалы, отвечающие следующим требованиям: низкая стоимость, термопластичность, растворимость, биodeградируемость, биосовместимость и возобновляемость [2]. Биodeградируемость – способность к деструкции под воздействием факторов природной среды или среды живого организма. Биосовместимость – это родственность тканям и жидкостям живого организма, человека или животного. При контакте с тканями не происходит, отторжения, токсикации и других побочных эффектов[2].

По происхождению и источнику получения биodeградируемые полимеры могут быть природного происхождения или синтетическими, рисунок 2.

Биоразлагаемые полимеры содержат гидролизуемые связи в полимерных цепях, при этом наибольший интерес представляют собой алифатические полимеры, в которых мономерные остатки связаны сложноэфирными группами, которые легко разлагаются и имеют довольно разнообразные физические, биологические и химические свойства [7].

Основные полиэфиры, которые нашли широкое применение в медицине: полигликолиевая кислота или полигликолид (ПГ), полимолочная кислота или полилактид (ПЛ), поли-ε-капролактон (ПКЛ), полипарадиоксанон, полигидроксibuтирата, полигидроксивалериат и другие.



Рисунок 2 – Природные и синтетические биоразлагаемые полимеры [7]

В таблице 1 приведены физико-химические свойства некоторых биodeградируемых полиэфиров.

Таблица 1 - Свойства биоразлагаемых полиэфиров

Полимер	Полилактид	Полигликолид
Формула элементарного звена	$\left[ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	$\left[ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{O} \\   \\ \text{H}_2 \end{array} \right]_n$
ММ, кДа	100-300	80-250
T ст, C <sup>0</sup>	60	37-42
T пл, C <sup>0</sup>	190-195	225-230
Степень кристалличности, %	30-80	35-65
Плотность, кг/м <sup>3</sup>	1250	1707
Растворители	хлороформ, бензол, диоксан, метиленхлорид, бутилацетат	гексафторизопропанол, гексафторацетон, м-крезол

Основополагающими характеристиками при оценке возможности применения биоразрушаемых высокомолекулярных соединений являются их термопластичность, растворимость, степень кристалличности и скорость деструкции [7].

Биоразлагаемые сложные полиэфиры возможно получить химическим (поликонденсация, полимеризация циклов) и микробиологическим методами путем синтеза полимеров или мономеров с помощью микроорганизмов. Наряду с гомополимерами особый интерес представляют сополимеры.

Наиболее распространенные биodeградируемые полиэфиры, используемые в биомедицинских целях – это полилактид, полигликолид, сополимеры на основе лактида и гликолида, а также полигидроксиалканоаты, прежде всего полигидроксибутират [7].

Полилактид, полигликолид, поли-ε-капролактон – являются продуктами полимеризации лактонов внутренних циклических сложных эфиров гидроксикислот, содержащие в кольце группу -C(O)O-.

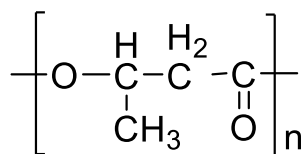
Полигликолид (-OCH<sub>2</sub>CO-)<sub>n</sub> - сложный линейный эфир; кристаллическое вещество белого цвета; плотность 1,707 г/см<sup>3</sup> (25 °C), t<sub>пл</sub>=230 °C. ПГ нетоксичен; относительно гидролитически устойчив в слабокислых и слабоосновных средах (в организме гидролизуется с постоянной скоростью); легко образует из расплава волокна, имеющие прочность до 550 Мн/м<sup>2</sup> и относительное удлинение 15-20%. В промышленности полигликолид получают катионной полимеризацией гликолида. Полигликолид применяют для изготовления хирургических рассасывающихся нитей (Дексон). Время полного рассасывания нитей из полигликолида четыре месяца. ПГ, разлагаясь до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O, полностью выводится из организма с мочой и выдыхаемым воздухом [7].

Полилактид - [полидилактид, поли (3,6-диметил-1,4-ди-оксан-2,5-дион)] [-OCH(CH<sub>3</sub>)C(O)-]<sub>n</sub>. В промышленности производят оптически активный полилактид - кристаллический непрозрачный бесцветный полимер изотактической структуры; степень кристалличности 30-80% в зависимости от условий получения; T стеклования 60°C, T пл. 190-195°C; плотность кристаллической и аморфной фаз 1,290 и 1,248 г/см<sup>3</sup> соотв.; ΔH°пл. ~ 93 Дж/г. Термоокислительная деструкция полилактида начинается при 240-250°C. В воде и водных растворах щелочей и кислот - медленно гидролизуется до молочной кислоты. Полилактид нетоксичен; в тканях живого организма подвергается биодеструкции с образованием нетоксичных продуктов. Полилактид получают

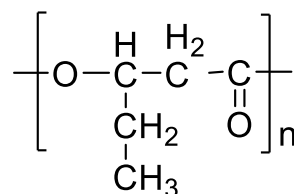
как синтетическим способом, так и ферментативным брожением декстрозы, сахара или мальтозы, которые являются возобновляемым сырьем биологического происхождения. В промышленности полилактид получают полимеризацией оптически активного лактида в растворе [7].

### 1.1.1 Полигидроксиалканоаты. Полигидроксибутират.

При росте некоторых микроорганизмов на средах, содержащих питательные углеродные вещества и имеющих дефицит азота или фосфора, микробные клетки начинают синтезировать и накапливать полигидроксиалканоаты (ПГА), которые служат им резервом энергии и углерода. При изменении окружающей среды в случае голода микроорганизмы могут разлагать ПГА и использовать образующиеся продукты для питания. Эту способность бактерий используют для промышленного получения полигидроалканоатов. Важнейшими из них являются полигидроксибутират (ПГБ) и его сополимер с полигидроксиивалератом (ПГВ):



поли (3-гидроксибутират)



поли (3-гидроксиивалерат)

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полностью биodeградируемые пластики. В почве при влажности 85% и температуре 20-60 °С разлагаются на воду и углекислый газ за 7-10 недель [7].

ПГВ бактериального происхождения был открыт в 1925 году во Франции у бактерий *Ralstonia entrophus* и *Bacillus megaterium*. Первое промышленное производство сополимеров ПГБ-ПГВ организовала в 1980 году английская фирма ICA. Полимер получил название Biopol. Он характеризуется относительной термостабильностью, пропускает кислород, устойчив к агрессивным химикатам и имеет прочность, сопоставимую с полипропиленом [7].

В противоположность полигликолидам, полилактидам или их сополимерам, поли(3-гидроксибутират) рассматривается, скорее, как умеренно резистентный материал по отношению к биodeградации в живом организме. Полигидроксиалканоаты по ряду физико-химических свойств сходны с широко

применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушающимися в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Свойства ПГА (молекулярный вес, кристалличность, механическая прочность и разрушаемость) могут существенно варьироваться в зависимости от условий биосинтеза и базовой структуры материала [7].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) занимают второе место среди биополимеров по значимости, после полилактидов [2]. Однако, ПГА имеют ряд преимуществ, такие как термопластичность и более высокая прочность. Ученые ведут работу над проблемами получения, изучения свойств и внедрения материалов на основе ПГА и в частности ПГБ. В этой связи можно предположить, что в скором времени полигидроксиалканоаты займут лидирующее место в ряду современных биополимеров.

Помимо микробиологического метода получения, возможен также синтез ПГБ из полиэтиленоксида. Основные свойства ПГБ представлены в таблице 2 [8].

Таблица 2 – Свойства полигидроксибутирата

Параметр	Значение
Температура стеклования, °С	15
Температура плавления, °С	175
Растворители	метиленхлорид, хлороформ, дихлорметан, трихлорэтилен, этиленкарбонат, пропиленкарбонат
Степень кристалличности, %	80

#### *Кристалличность и теплофизические свойства ПГБ.*

Исследованию надмолекулярной структуры ПГБ посвящено много работ [9-13], нужно отметить, что эта тема достаточно подробно разработана. В работе [9] представлены результаты изучения зависимости степени кристаллизации от различных факторов, установлено, что изотермический процесс кристаллизации ведет к увеличению степени кристалличности [9].

Исследование процесса плавления с помощью ДСК [11] в разных режимах: нагрев-охлаждение, изо-сканирования, пошагового сканирования и квази-изотермического плавления. В работе [11] представлен метод оценки степени

кристалличности по методу соотношения интенсивности спектров ФТ-спектроскопии рекомбинационного рассеяния, соответствующих аморфным и кристаллическим областям [11].

F. Spieckermann и соавторы в работе [12] представили результаты изменения внутренней морфологии ПГБ в результате сжатия, полученные с помощью метода рентгеновской дифракции с использованием синхротронного излучения. Было установлено, что в условиях сжатия, деформации макромолекул не наблюдается, следовательно, пластическая деформация обусловлена другими механизмами [12].

В работе [13] с помощью терагерцовой двумерной корреляционной спектроскопии был изучен процесс изотермической кристаллизации ПГБ. Установлено, что формированию четкой кристаллической структуры предшествует образование водородных связей  $\text{C-H} \cdots \text{O} = \text{C}$  [13].

#### *Деструкция ПГБ*

Деструкция высокомолекулярных соединений может быть биологической и не биологической. Биологическая деструкция подразумевает разрушение полимерной цепи под воздействием микроорганизмов, ферментов и среды живого организма. Не биологическая деструкция обусловлена физическими факторами (температура, влага и т.д.) [14]. С точки зрения деструкции биополимеров особый интерес представляет деградация под воздействием внешних факторов, существующих в природной среде, а также в среде живого организма [14].

Процесс деструкции биополимера обычно делят на две стадии. На первой происходит разрыв макромолекулярных цепей без потери веса образца, на второй стадии низкомолекулярные фрагменты вымываются из полимера, соответственно вес образца начинает снижаться [15]. В разных источниках есть разные данные относительно механизма деструкции полигидроксибутирата. В работе [16] приведены данные свидетельствующие о повышении степени кристалличности с течением деструкции, что говорит о том, что деструкция начинается в аморфных областях. В работе [17], напротив, говорится, что деструкция начинается одновременно как аморфных, так и в кристаллических областях.



Скорость деструкции полигидроксибутирата в среде живого организма ниже, чем у полилактида и сополимеров ПГБ. Кроме того наблюдается острая иммунологическая реакция тканей на образцы чистых полимеров ПГБ и ПЛ [17].

Полигидроксибутират подвержен также и фотодеструкции [18]. В результате облучения происходят как разрывы цепей, так и реакции межмолекулярной сшивки. В результате были отмечены изменения молекулярного веса, химических и кристаллических структур, тепловых, морфологических, оптических и механических свойств, а также от способности к биологическому разложению. Было отмечено, что в результате фотодеструкции степень кристалличности на поверхности образца возрастает, что приводит к снижению начальной скорости ферментативной деструкции образца [18].

Особое практическое значение представляют экспериментальные данные, основанные на исследованиях деградации полигидроксибутирата под воздействием естественных факторов природной среды. Пленочные образцы ПГБ выдержанные в почве в течение 100 суток, при температуре  $25 \pm 2$  °С, показали снижение массы образца на 15% [19]. Деструкция также наблюдалась в водной среде, под воздействием ультрафиолетового излучения [20]. Лабораторные исследования в условиях имитирующих природные факторы показали, что на скорость ферментативного разложения полигидроксибутирата оказывает существенное влияние молекулярная масса образца и температура. Так, в одинаковых условиях [выдерживание в течение 84 суток при температуре 37 °С, в среде слабощелочного буфера) потеря массы образца ПГБ с  $MM=150$  кДа достигла 12% от изначальной массы, а для образцов с  $MM$  от 300 до 1000 кДа максимальная потеря веса составила всего 2%. При температуре 70 °С, наблюдается значительная интенсификация процесса деструкции, потеря веса достигает 50% и 20% для образцов с начальной  $MM=150$  кДа и 300-1000 еДа, соответственно. Интересно отметить что, снижение молекулярной массы наблюдалось во всех экспериментах, и наиболее интенсивно в первые 40 суток [21].

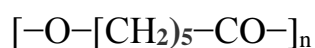
В работе [22], исследована деградация пленок из поли[3-гидроксибутирата) и сополимера в солоноватоводном (содержание солей 14-18 г/л,  $pH=8,9-8,5$ ) озере Шира на различных глубинах: 3, 9, 13 и 20 м, соответствующих горизонтам

стратификации (расслоение по плотности) озера. Наиболее активно деградация пленок наблюдается на глубине 3м, - 9% в течение 50 суток, в наиболее прогреваемом и аэрируемом горизонте озера. Кроме того, было зафиксировано снижение молекулярной массы, характерной для всех образцов [22].

Аналогичные результаты представлены в работе [23] в условиях тропической морской среды, в Южно-Китайском море (Нячанг, Вьетнам). Установлено, что биологическое разложение в большей степени зависит от размера и формы деградируемого элемента полимера и способа приготовления, чем от химического состава полимерных материалов. Для всех образцов отмечено падение молекулярной массы и рост полидисперсности, а степень кристалличности, напротив, остается практически неизменной [23].

### 1.1.2 Поликапролактон

Поликапролактон — это полимер, относящийся к алифатическим сложным полиэфирам линейно структуры, производится из нефтехимических продуктов.



Впервые ПКЛ был синтезирован группой ученых под руководством Карозерса в тридцатых годах прошлого века [24]. Коммерческую целесообразность он приобрел благодаря таким свойствам как биосовместимость и биodeградируемость [25]. ПКЛ- гидрофобный полимер со степенью кристалличности 60-80%.

Основные свойства ПКЛ приведены в таблице 3 [26]:

Таблица 3 – Свойства поликапролактона

Параметр	Значение
Температура стеклования, °С	-60
Температура плавления, °С	63
Растворители	Бензол, толуол, метиленхлорид, хлороформ, CCl <sub>4</sub> , Тетрагидрофуран, Циклогексанон, Метилэтилкетон, Диметилформамид, Ацетон, Этилацетат
Степень кристалличности, %	80

Растворимость в большом количестве доступных растворителей и низкая температура плавления, совместимость с некоторыми полимерами, наряду с биосовместимостью и биodeградируемостью, создали предпосылки для его

применения в медицинских областях [27-29]. В 70-х - 80-х годах прошлого столетия, во времена «бума биodeградируемых полимеров», ПКЛ и его сополимеры широко применялись для разработки систем с контролируемым высвобождением лекарственных веществ. Кинетика деструкции, а также механические свойства поликапролактона сделали его перспективным для получения эндопротезов. Путем добавления функциональных групп возможно регулировать такие важные для культивации клеток свойства как гидрофильность, адгезия или биосовместимость. Однако, в последние 20 лет, внимание, направленное на поликапролактон постепенно угасло, в связи с тем, что в заместительной хирургии больший интерес вызвали исследования в области применения металлических изделий, а в области лекарственных систем пролонгированного действия внимание было сосредоточено на быстро разлагаемых полилактиде и полигликолиде [24]. Возобновление интереса к ПКЛ произошло вместе с появлением совершенно новой области биомедицинской технологии – тканевой инженерии. Благодаря реологическим и вязкостным свойствам технология получения матриксов различного назначения из поликапролактона оказалась сравнительно простой, что позволило ему превзойти многие деградируемые полимеры. Полученное еще во времена былого пика популярности одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США дало возможность ПКЛ быстро выйти на рынок [24].

Как уже отмечено выше, интерес к данному полимеру в медицинской сфере обусловлен, прежде всего тем, что ПКЛ в определенные (более длительные, чем полилактид и полигликолид) сроки может разлагаться на безопасные для человеческого организма компоненты. В зависимости от сферы применения используют поликапролактон различного молекулярного веса от 2 000 до 100 000 Да.

Способность ПКЛ образовывать прочные и эластичные нити, волокна и пленки связана с большими размерами и характерным линейным цепным строением молекул, что, в свою очередь, позволяет создавать конструкции пластичные и механически прочные одновременно [24].

Поликапролактон используют в смеси с такими полимерами, как целлюлоза, пропионат и бутират ацетата целлюлозы, полилактид и сополимер лактида и гликолида. Смеси ПКЛ с другими полимерами используются для снижения хрупкости, увеличению окрашиваемости, гидрофобности, адгезии и для регуляции скорости высвобождения лекарственных веществ [27]. Установлено, что сополимеры ПКЛ содержащие такие элементарные звенья, как этиленоксид, винилхлорид, этиленоксид, стирол, уретановые звенья, тетрагидрофуран (ТГФ), диликолид, дилактид, валерлактон, стирол, метилметакрилат и винилацетат, значительно увеличивают совместимость в полимерных смесях [28].

В ряде экспериментов доказана высокая биологическая совместимость ПКЛ. Полимер обладает хорошими адгезивными свойствами по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам и низкой клеточной токсичностью [24]. Все это лишний раз подтверждает, что продукты деградации поликапролактона оказывают минимальное токсическое воздействие на ткани организма [24].

#### *Биодеградация поликапролактона*

ПКЛ разлагается в два этапа. Сначала постепенно уменьшается молекулярная масса поликапролактона без деформации тканеинженерной конструкции.

По мере уменьшения молекулярной массы ПКЛ начинает расщепляться на фрагменты, затем следует абсорбция и выведение. В естественных условиях деградация ПКЛ происходит главным образом гидролитическим процессом в течение 2—3 лет с образованием таких продуктов деградации, как вода, углекислый газ и капроновая кислота. Причем чем ниже молекулярный вес поликапролактона, тем короче сроки деградации. В условиях *in vivo* волокна поликапролактона деградируют, создавая при этом хорошую основу для роста клеток, которые могут сформировать ткань [7].

Когда полимер считается биодеградируемым, необходимо иметь в виду, что это совсем не означает, что он является биорезорбируемым, равно как и отвод продуктов деградации, не означает, что они выводятся из организма. Биорезорбция – это понятие, которое подразумевает полную ликвидацию

инородного материала, а также низкомолекулярных продуктов его разложения, и что не маловажно отсутствие остаточных побочных эффектов [30]. Поликапролактон деградирует под воздействием таких живых организмов как бактерии и грибы, однако, ПКЛ не разрушается в среде живого организма, ввиду отсутствия соответствующих ферментов [31]. Это не означает, что ПКЛ не является биорезорбируемым, а скорее говорит о более продолжительном процессе, который протекает по механизму гидролитической деструкции. Известно, что процесс гидролиза может протекать на поверхности или в массе полимера вследствие диффузии молекул воды. Поверхностный гидролиз или эрозия подразумевает деструкцию полимерных цепей только на поверхности образца [32]. Этот процесс возникает, когда скорость деструкции цепи и диффузии олигомеров и мономеров в окружающую среду выше, чем скорость диффузии воды внутрь образца. В этом случае наблюдается истончение и потеря веса образца, в то время как молекулярный вес полимера внутри образца остается неизменным. Преимущество данного механизма, - предсказуемость процесса, и как следствие возможность управления скоростью высвобождения лекарственных компонентов [33]. Деструкция в массе происходит за счет диффузии молекул воды внутрь полимерного образца. Она сопровождается снижением молекулярного веса цепи всей полимерной матрицы, снижением массы образца. В том случае, когда олигомеры и мономеры вымываются из объема полимерной матрицы за счет диффузии воды, наступает равновесие процессов эрозии и гидролитической деструкции в массе образца, иначе наступает автокаталитический эффект, вызванный ростом числа карбоксильных групп и кислотностью среды внутри образца. Это приводит к тому, что полимер на поверхности будет обладать более высокой молекулярной массой, чем внутри образца [34]. Подобный процесс может привести к накоплению внутри образца низкомолекулярных продуктов гидролиза, которые по достижению достаточно малых размеров быстро вымываются из образца через высокомолекулярный поверхностный слой. Это сопровождается быстрой потерей массы образца, и может вызвать воспалительную реакцию [34]. Кроме того, могут возникнуть и другие негативные последствия, так, например, в случае с волокном из ПГА,

используемом в ортопедической хирургии, в ситуации, когда ткани не способны к изменению рН среды ввиду плохой васкуляризации или низкой метаболической активности, вследствие быстрой деструкции происходит местное скопление жидкости и увеличение осмотического давления [35].

Срок деструкции изделия из чистого поликапролактона от 2 до 4 лет, в зависимости от молекулярной массы полимера, формы и массы образца [36-38]. Скорость гидролиза может быть изменена путем сополимеризации с другими лактонами, лактидом или гликолидом [39]. Масштабные исследования *in vitro* и *in vivo* деструкции поликапролактона на примере межпозвоночных эндопротезов показали равномерное молекулярно-массовое распределение в сечении образцов в течение 6 месяцев, то есть отсутствие автокаталитических явлений в процессе деградации [40]. В литературе также приведены данные о деградации в условиях *in vitro* и *in vivo* (кролик), где отмечена схожесть этих процессов, из чего сделан вывод, что на начальном этапе до 12 месяцев, ферментативная активность не оказывает особого влияния на течение процесса [41,42]. Экспериментальные данные свидетельствуют о двухстадийности процесса разложения поликапролактона. На первой стадии протекает не ферментативный гидролиз сложноэфирных групп, на второй стадии, когда полимер содержит преимущественно кристаллические области, а молекулярная масса полимера снижается до 3000 и начинается процесс внутриклеточной деструкции, с участием фибробластов, макрофагов и гигантских клеток [43]. Таким образом, можно сделать вывод, что поликапролактон с молекулярной массой ниже 3000, может быть полностью резорбирован по механизму внутриклеточной деградации. Также было отмечено, что скорость деструкции на первой стадии процесса *in vivo* идентична скорости процесса *in vitro* при температуре 40° и подчиняется кинетике первого порядка. Из чего сделан вывод, что деструкция полимера обусловлена гидролизом случайных сложноэфирных связей.

Чен и др. [44] изучали процесс разложения микрочастиц и пленок из ПКЛ *in vitro* в среде буферного раствора рН=7,4 при температуре 37°С. Сколько-нибудь существенного влияния формы образца на кинетику деструкции выявлено не

было, что позволяет предположить, что в ходе процесса преобладает равномерный гидролиз в массе полимера [44].

В литературе представлены экспериментальные данные о результатах исследования нескольких видов термической деструкции поликапролактона [44]. Персенали и др. представили данные о двухстадийном процессе разложения полимерной цепи ПКЛ [45], на первом этапе наблюдалась реакция разрыва цепи по эфирным группам по реакции пиролиза, на втором этапе установлено образование циклического мономера капролактона, в результате расширенной реакции деполимеризации. Шивалингам и др. исследовали термическую деструкцию ПКЛ в растворе и сухом полимере [46, 47]. Установлено, что в растворе деполимеризация протекает путем случайного разрыва цепи, а в сухом виде наблюдается отщепление концевых звеньев.

Экспериментально подтверждено, что скорость деструкции *in vitro* и *in vivo* возрастает с уменьшением молекулярной массы [42,43], а также при наличии иных элементарных звеньев [48, 49].

Группой авторов [40] представлены результаты исследования *in vitro*, и *in vivo* деградации матриц из обычного и медицинского ПКЛ. Установлено, что эрозия поверхности образцов сопровождается изменением степени кристалличности, которое носит циклический характер [40].

Как упоминалось выше, ПКЛ является весьма перспективным для применения в области медицины и в частности в тканевой инженерии. Группа Голландских ученых одними из первых исследовали матрицы из сополимеров поликапролактона для культивации нервных тканей. В работе были исследованы деградация и реакция тканей организма (крыс) в течение года при подкожной имплантации пленок из политриметиленкарбоната (ПТМК) и сополимеров триметиленкарбоната (ТМК) с лактидом (52 моль %) или капролактоном (89%) [50]. Образцы из чистого ПТМК показали активную деграцию в течение 3 недель и были полностью резорбированы в течение года. Наблюдалось быстрое уменьшение толщины образца и его массы на фоне неизменной молекулярной массы. Сразу после имплантации наблюдалась острая воспалительная реакция, которая в последствии смягчалась, но присутствовала на протяжении всего

периода резорбции. Был сделан вывод, что деградация образцов проходила по механизму поверхностной эрозии с участием клеточно-опосредованных процессов. Деструкция сополимеров проходила по автокаталитическому механизму гидролиза эфирных связей и имела меньшую скорость по сравнению с чистым полимером. [50]. Образцы сополимера ТМК с лактидом показали скорость деструкции в двадцать раз выше, чем образцы сополимера с капролактоном. В обоих случаях реакция организма напоминала так называемую асептическую воспалительную реакцию, которая впоследствии сопровождалась фиброзной инкапсуляцией. Значительная потеря массы, а именно – 96% за год наблюдалась только у образцов сополимера ТМК-КЛ. Потеря массы спровоцировала умеренную реакцию тканей организма, обусловленную диффузией продуктов деструкции полимеров. Исследования показывают, что ПТМК и сополимеры ТМК с лактидом или капролактоном подходят для разработки изделий как с высокой, так и с низкой скоростью биорезорбции [50].

Большее сроки биодеградации поликапролактона, в сравнении с полилактидом и полигликолидом, делают его перспективным для разработки изделий долговременного (от года) существования в организме и длительными сроками биодеградации.

## **1.2 Методы получения полигидроксибутирата и поликапролактона.**

### **1.2.1 Получение и выделение полигидроксибутирата.**

Классическим методом получения полигидроксиалканоатов, и ПГБ в частности, является синтез полимера микроорганизмами-продуцентами. ПГБ служит источником питательных веществ [51], а также формирует защитную пленку и способствует сохранению жизнеспособности бактерий в условиях низких температур [52].

В настоящее время, рост объема производства микробиологических полиэфиров ограничен высокой стоимостью процесса синтеза и очистки.

Основная работа по поиску новых путей синтеза ПГА идет в следующих направлениях[53]:

– поиск альтернативных источников углерода для продуцентов.



- оптимизация технологии процесса с известными штаммами продуцентами ПГБ;
- генная модификация микроорганизмов.

Типичным прекурсором для микробиологического синтеза ПГБ являются глюкоза, сахароза и крахмал. Однако, во многих странах мира ведутся широкомасштабные разработки, имеющие своей целью культивацию микробиологических полиэфиров с применением в качестве питательной среды стоков и отходов различных процессов пищевого производства, а также других альтернативных источников углерода [53].

Существенный интерес представляют работы [54] и [55], где описан новаторский метод синтеза ПГБ с использованием в качестве субстрата сахарного тростника в лабораторных условиях [55] и в качестве «сопутствующего» производства на сахарных и этанольных фабриках [54]. Встраивание индустриального получения ПГБ начиная с сырья – сахарного тростника, делает возможным снижение стоимости килограмма получаемого продукта в 4-5 раз, в сравнении с известными ранее процессами получения. Такое снижение цены обусловлено широким использованием побочных продуктов технологии по переработке сахарного тростника, особенно жмыха и субстрата сахарозы в больших количествах. В представленном процессе отходы производства сжигают для получения паровой и электрической энергии, которая используется для процесса производства. Взамен классического метода экстракции ПГБ с использованием хлорированных агентов, на заводе интегрирован метод с использованием спиртов со средней длиной цепи, являющихся побочными продуктами получения этанола. Путем интеграции данного инновационного процесса, решены основные недостатки процесса получения ПГБ, связанные с низкой рентабельностью и экологическими проблемами [54,55].

В статье [56] представлены исследования, основанные на использовании в качестве источника углерода смеси отходов молочного производства, рисовых отрубей и морской воды. Установлено оптимальное сочетание компонентов смеси, а также уровень кислотности (pH=9), способствующий процессу синтеза. Максимальный выход ПГБ составил 6.37г/л [56].

А. Daneshi и соавторами предложена технология синтеза ПГБ, с использованием в качестве питательной среды кукурузного сиропа, который является побочным продуктом производства крахмала. Состав реакционной смеси был рассчитан методом математического моделирования. Максимальная производительность (0,17 г/л\*ч) была спрогнозирована для смеси с соотношением сироп/сульфат аммония/дигидрофосфаты – 50/0,078/1. Экспериментальные данные подтвердили расчетную модель [57].

Эффективным оказалось использование в качестве прекурсора масла ятрофы. В составе этого масла на долю пальмитиновой кислоты, олеиновой кислоты и линолевой кислот приходится 93,9 %. Эксперимент со штаммом *Cupriavidus Necator H16* показал высокий показатель накопления ПГБ – 87% массовых от сухого веса клеток. Максимальный выход составил 0,78г ПГБ на 1 г масла ятрофы. В этом исследовании, впервые, доказана возможность использования масла ятрофы в качестве источника углерода для продуцирования микробиологического ПГБ. Интересно отметить, что токсины ятрофы не влияют на процесс синтеза. Несомненно, данный метод обладает большим потенциалом для крупномасштабного производства [58].

Интересным и инновационным прекурсором для синтеза ПГБ выступает глицерин [59-63]. Глицерин является продуктом распада биодизеля. Биодизель — биотопливо на основе растительных или животных жиров, а также продуктов их этерификации [64]. 23 страны, в их числе Япония, Китай, США, Канада, Евросоюз и многие другие, участвуют в биодизельной программе. То есть в этих странах законодательно закреплено применение биодизеля в виде добавочного компонента к дизельному топливу от 2 до 10% [59-64].

Сточные воды из нефтехимической промышленности содержат большое количество эмульгированных алифатических или ароматических углеводов, которые приводят к загрязнению практически всех природных ресурсов, однако содержание углеродосодержащих веществ делают такие стоки потенциальным прекурсором для синтеза микробиологических полимеров, в частности ПГБ. Например, штамм *Haloarcula Sp. IRU1* выделенный из вод озера Урмия в Иране, способен продуцировать ПГБ, используя в качестве источника углерода

нефтехимические отходы. Были определены оптимальные условия для максимально эффективного синтеза ПГБ, а именно – концентрация нефтехимической сточных вод 2% (в виде источника углерода), триптон 0,8% (в качестве источника азота), КН 2 РО 4 0,001% (в качестве источника фосфора), температура 47 ° С [65].

Оптимизация условий культивации микробиологических ПГА является следующим шагом к производству в промышленном масштабе, то есть исследование влияния внешних факторов, таких как температура, аэрация, и т.д.

Yung-Hun Yang и др. в своем исследовании [66] использовали экспериментальные данные для разработки модели позволяющей повысить эффективность накопления ПГБ в случае использования в качестве субстратов пальмового масла и отходов мукомольного производства с применением классического штамма *Ralstonia eutropha*. Экспериментально установлено, что рост клеток и выход ПГА увеличивается в 1,5 раза при увеличении доли бутирата. Оптимизация содержания фосфатного буфера в среде, содержащей большее количество бутирата, позволила стимулировать клеточный рост и синтез ПГА больше, чем в 4 раза [66].

Интересные результаты представлены в статьях [67, 68]. Исследования, проводились с использованием штамма *Cupriavidus Necator*. В состав питательной смеси были введены компоненты, создающие стрессовые условия функционирования клеток: введены этанол в количестве 0,5% и перекись водорода. Перекись вводили в две стадии: до начала культивирования – в количестве 0,5 моль/л и через 60 часов - 5 моль/л. Это привело к росту ферментативной активности и, как следствие, эффективность синтеза увеличилась на 30% по сравнению с контрольным процессом. Молекулярная масса ПГБ, полученного в условиях стресса, была значительно выше по сравнению с контрольными процессами культивирования. Установлена зависимость молекулярной массы от концентрации факторов стресса [67, 68].

В работе [69] отражены результаты исследования влияния интенсивности аэрации на процесс синтеза ПГБ. В качестве продуцента использовался штамм кишечной палочки, источником углерода служили глицерин и глюкоза. Глюкоза

является классическим субстратом для микробиологического ПГБ, глицерин – прекурсор сравнительно новый, и оптимизация технологии синтеза ПГБ на его основе – очень важная задача. Установлено, что при низкой интенсивности перемешивания, глицерин стимулирует формирование ПГБ, а вот для глюкозы наблюдается обратная ситуация. Максимальная эффективность продуцирования в среде глицерина была достигнута при 125 оборотах в минуту, за 24 ч содержание ПГБ составило 30,1% (вес / вес), относительная молекулярная масса 1,9 МДА, это близкой к ПГБ синтезированному с использованием глюкозы [69].

Ввиду существенной продолжительности процесса микробиологического синтеза (до 350 часов), немаловажной является задача стабилизации накопленного полимера в теле микроорганизмов. В работе [69] поставлен акцент на изучение процесса потребления бактериями накопленного ПГБ. Для оценки факторов, определяющих условия, в которых бактерии, используют накопленный ранее ПГБ, в качестве источника питательных веществ, из реакционной среды полностью был выведен метан и азот. Штаммы были выдержаны в этих условиях 48 часов. В течение этого времени бактерии не расходовали накопленный ПГБ. Напротив, в присутствии метана и азота бактерии потребляли как метан, так и полигидроксibuтират. Так же было установлено, что добавление формиата в реакционную среду ведет к подавлению потребления микроорганизмами ПГБ [69].

Особый интерес представляет работа Моджтаба Таран, в которой для прогнозирования оптимальных условий продуцирования ПГБ использована математическая модель расчета оптимального значения переменных параметров в системе управления качеством. Лучший результат (63,0% от сухого веса клеток) для штамма *Haloarcula Sp. IRU1* был получен в условиях: 2 г / л глюкозы, 0,2 г / л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,004 г / л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и при температуре 42 ° С. В целом, результаты свидетельствуют, что *Haloarcula sp. IRU1* имеет высокий потенциал для синтеза ПГБ из глюкозы [70].

Генная модификация продуцентов позволяет увеличить количество штаммов способных к культивированию ПГБ, повысить эффективность накопления

полимера в теле микроорганизма, регулировать состав сополимеров и молекулярную массу.

Рекомбинация генома кишечной палочки (*Escherichia coli*), посредством введения генов традиционного продуцента ПГБ *Ralstonia eutropha* дала возможность получения сверхвысокомолекулярного ПГБ [71]. Большинство классических штаммов кишечной палочки утилизируют глюкозу в процессе синтеза ПГБ, а к переработке сахарозы не способны. Однако, сахароза имеет ряд преимуществ экономических и экологических. Путем удаления гена, отвечающего за кодировку белка, подавляющего экспрессию генов утилизации сахарозы, был создан трансгенный штамм *Escherichia coli*, способный синтезировать ПГБ из сахарозы на 30% более эффективно, чем из глюкозы. Это дает возможность использования сахарозы в качестве промышленного прекурсора в процесс биосинтеза полигидроксибутирата. [72]. Посредством введения гена, отвечающего за синтез ПГБ получены новые трансгенные штаммы, пригодные к продуцированию, например, *Streptomyces exfoliates* [73], *Pseudomonas extremaustralis* [74].

Способность продуцировать полигидроксибутират показали не только бактерии, но и водоросли [75, 76]. Гены, отвечающие за синтез ПГБ были успешно внедрены в ядерный геном штамма *Chlamydomonas reinhardtii* и *Phaeodactylum tricornutum*. С помощью газовой хроматографии-масс-спектрологии в сравнении с контрольным образцом, было установлено присутствие гранул ПГБ в цитоплазме. Что свидетельствует о возможности использования водорослей для синтеза полигидроксибутирата [75].

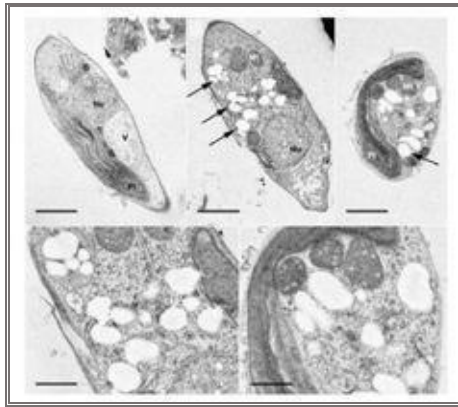


Рисунок 3 - Флуоресценция и электронно-микроскопические анализы на ПГБ накопления в *P. Tricornutum* [76]

Ограничивающим фактором применения полигидроксибутирата, является высокая стоимость. На первый план выходит вопрос разработки не дорогой технологии получения ПГБ и других ПГА [77]. Объем накопленных знаний и экспериментальных данных позволяет вести полномасштабные разработки технологических процессов с использованием известных штаммов и на основе различных прекурсоров.

Весьма эффективным оказалось использование для синтеза ПГБ биореактора эрлифтного типа. Такие реакторы применяются для промышленного культивирования клеток в суспензии, он имеет внутренний контур циркуляции смеси и обеспечивает высокую интенсивность перемешивания и массопередачу кислорода. В качестве продуцента использовали *Burkholderia sacchari* источником углерода выступала сахароза. Процесс проходил в две стадии, на первой стадии накопление ПГБ составляет 13%, на второй уже 42%. Максимальная производительность ПГБ – 1.7 г/л\*ч, выход из сахарозы – 0,22г/г [78].

Китайскими учеными был разработан нестерильный процесс синтеза ПГБ непрерывного типа [79]. В качестве продуцента выступает штамм *Halomonas TD01*, выделенный из соленого озера в Синьцзяне, Китай, источником углерода выступает глюкоза. Ранее, данный штамм показал высокую эффективность в условиях периодического процесса в соленой воде - после 56 часов, выход составил – 80 г/л сухого веса клеток, содержащих 80% полигидроксибутирата. На его основе предложен непрерывный нестерильный двухстадийный процесс. Выход после второй стадии составил 40 г/л сухого веса клеток, с содержанием полигидроксибутирата около 70% [79].

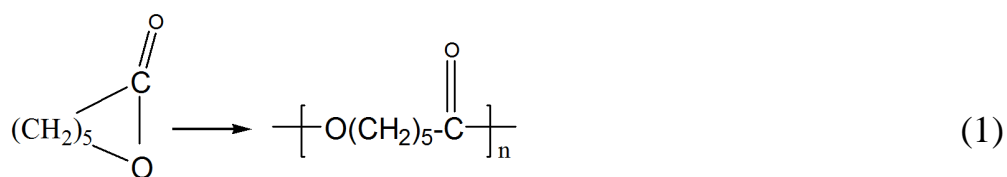
Беспрецедентный, высокорентабельный процесс непрерывного производства ПГБ был разработан в России. Непрерывный процесс включает в себя, многоступенчатую систему, состоящую из пяти непрерывных реакторов с

мешалкой в серии (5-SCR), которую можно рассматривать как инженерную замену трубчатого реактора идеального вытеснения. В первом реакторе идет сбалансированный рост бактерий, в последующих реакторах, в среде пониженного содержания азота идет процесс накопления ПГБ. Производительность линии составляет - 1.85 г/л\*ч. В качестве штамма продуцента был использован *Cupriavidus Necator* [80].

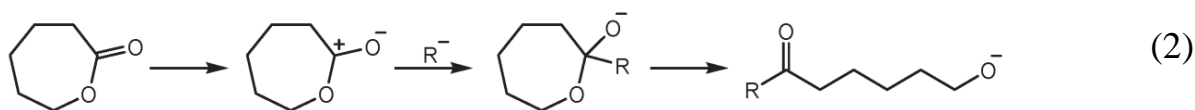
### 1.2.2 Синтез поликапролактона.

Поликапролактон является синтетическим полиэфиром. Существуют два основных пути получения ПКЛ, это поликонденсация 6-гидроксигексановой кислоты и полимеризация с раскрытием цикла капролактона. Реакция поликонденсации проводится под вакуумом, который создается для удаления воды, выделяющейся в ходе реакции, что позволяет сместить равновесие в сторону получения полимера. Реакция проходит в отсутствие катализатора при возрастающей температуре от 80 до 150 °С, и завершается за 6 часов. Также в литературе описана реакция поликонденсации в присутствии липазы различных грибов в вакууме. Однако этот метод имеет ряд недостатков и не так распространен, как полимеризация капролактона [81].

История получения ПКЛ по методу полимеризации циклического ε-капролактона, начинается в тридцатых годах прошлого столетия [82]:



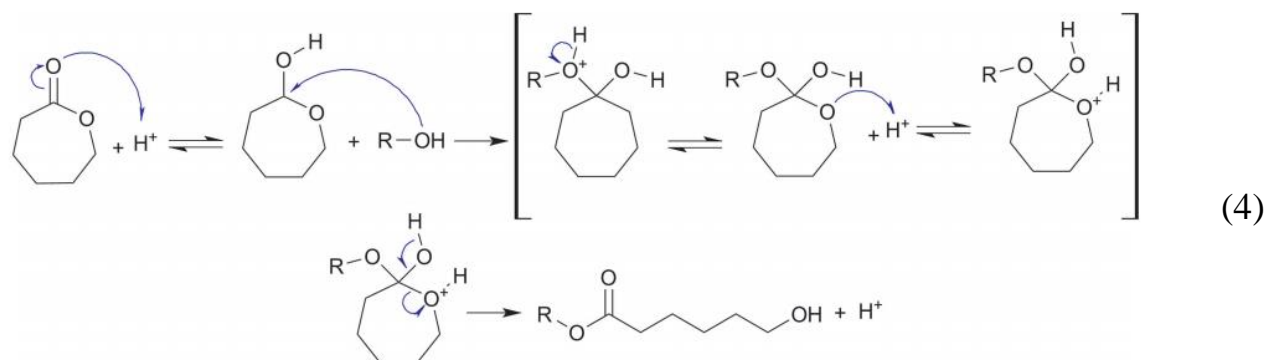
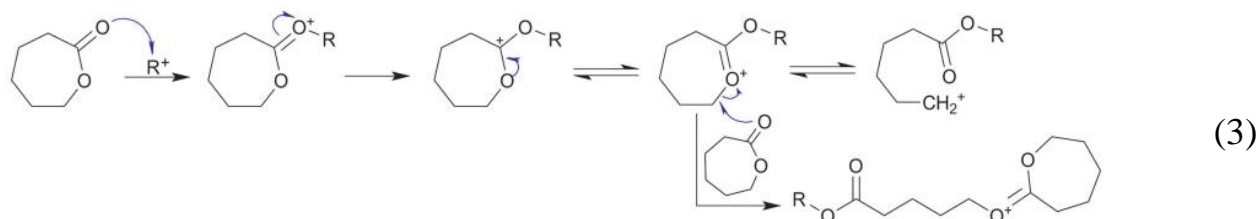
В зависимости от катализатора существуют четыре основных механизма полимеризации циклов: анионный, катионный, мономер-активация и координация-вставка.



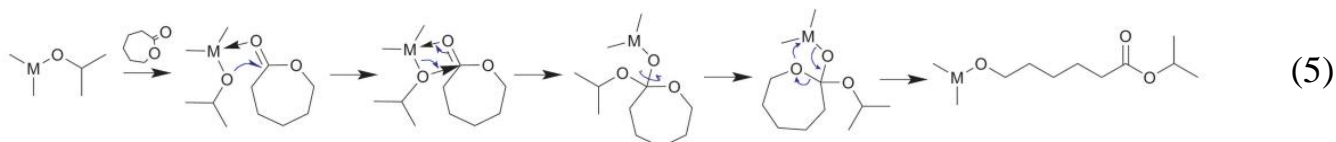
Анионный механизм подразумевает образование анионных комплексов, которые раскрываются:

(Основным недостатком данного метода является значительная внутримолекулярная переэтерификация, на более поздних стадиях полимеризации. Это приводит к снижению молекулярной массы полимера, остановке полимеризации или получению циклических полимеров [83].

Катионный механизм заключается в формировании радикала катионного вида, который в последствии атакует кислород карбоксильной группы мономера посредством реакции нуклеофильного бимолекулярного замещения:



Активация мономера, предполагает активацию молекулы мономера с помощью катализатора и последующим присоединением активированного мономера к концу полимерной цепи:



Координация-вставка – наиболее распространенный вид полимеризации циклов, на самом деле является частным случаем анионного механизма. Процесс подразумевает ориентацию мономера и катализатора с последующим образованием связи металл-кислород между катализатором и молекулой



мономера. Дальнейший рост цепи происходит за счет присоединения к металлу связи С-О:

В процессе полимеризации, благодаря присутствию катализатора может возникнуть реакция переэтерификации, которая бывает, как межмолекулярная, так и внутримолекулярная. Как правило, эти реакции начинаются на поздних стадиях реакции полимеризации в условиях высоких температур. Это приводит к росту полидисперсности и потери контроля над процессом [83].

Конечная молекулярная масса полимера, молекулярно-массовое распределение и наличие функциональных групп могут варьироваться в зависимости от механизма полимеризации[84]. Как правило, ПКЛ получают с молекулярной массой от 3 000 до 80 000 [85].

### **1.3 Полимерные материалы медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полиэфиров, и методы их получения.**

Направление применения биodeградируемых материалов определяет разработку биodeградируемых полимеров с нужным комплексом свойств. Медицинские сферы применения биополимеров включают хирургическое применение медицинских имплантатов, тканевую инженерию, создание новых лекарственных форм в фармацевтике, создание новых материалов для стоматологии и другие. Их используют в качестве рассасывающихся шовных нитей, матриц контролируемого высвобождения лекарств, тары для различных медпрепаратов, антиадгезионной присыпки для хирургических перчаток и др. [82]. При применении в медицине полимеров, способных к биодеструкции, сокращается срок нахождения больного в стационаре, снимается необходимость повторных операций для удаления металлических конструкций, снижается эффект привыкания к лекарству и расход дорогостоящих препаратов на курс лечения, уменьшается число перевязок и загруженность медицинского персонала. Все вышеуказанные факторы дают экономический эффект в виде снижения экономического ущерба предприятий от повышенной заболеваемости рабочих, расходов на содержание больных в стационаре и т.д. [86]

Биосовместимость биodeградируемых полимеров этой группы обеспечивает не только отсутствие аллергических реакций тканей, но и возможность ферментативной деструкции полимеров с образованием естественных для организма продуктов метаболизма. Раньше считалось, что биосовместимость определяется инертностью и гидрофобностью материалов, однако исследования последних лет показали, что поверхность имплантата должна обладать определенным балансом гидрофильно-гидрофобных и других свойств, чтобы стимулировать адгезию клеток организма, но препятствовать тромбообразованию и адгезии бактерий. Таким образом, в идеале поверхность имплантата должна быть своеобразным смарт-материалом, распознающим разные клетки и адекватно перестраивающимся. [87]

При использовании полимеров в медицине, в областях, связанных с эндохирургией, в целях временного замещения тех или иных тканей организма на период лечения и последующего роста здоровых клеток ферментативный гидролиз является практически единственным способом деструкции полимера, выполнившего свою физиологическую функцию. Фрагменты полимерной цепи захватываются клетками ретикуло-эндотемальной системы и других органов в результате различных видов эндоцитоза, в ходе которого происходит их биодеструкция до более легких и даже низкомолекулярных фрагментов, после чего низкомолекулярные продукты гидролиза полимеров выводятся из организма в результате почечной фильтрации [7].

Для применения биodeградируемых полимеров в медицине необходимо точно знать такие их характеристики, как скорость деструкции в организме, скорость потери прочности, потери массы и т.д. Следует изучить зависимость данных характеристик от геометрии полимерного образца, от материала, из которого он состоит, от способа, которым был получен данный образец. Так известно, что при биodeградации полилактонов сначала идет падение молекулярной массы и лишь по достижению молекулярной массы 10 000 происходит фагоцитоз с дальнейшим разложением полимера до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  или других низкомолекулярных метаболитов в зависимости от типа полиэфира [7].

Сохранение необходимой механической прочности в течение определенного времени важно, как для изделий выполняющих несущую функцию, например, штифтов, винтов и т.д. так и для изделий, способствующих сращиванию тканей, например, шовного материала [7].

Основные направления применения полилактонов и полигидроксиалканоатов в медицине:

1) в хирургии

- шовные рассасывающиеся нити (хирургия глаза, полостная хирургия);
- пленочные и волокнистые раневые покрытия;
- материалы для ортопедии (рассасывающиеся импланты: винты, штифты, пластины, стержни, скобы);
- реконструктивная челюстно-лицевой хирургия (костные и мягкие ткани);
- управляемая регенерация тканей (эпителий, фибробласты, гладкие ткани, костная ткань)

2) в терапии

- медикаменты длительного высвобождения (подкожный имплантат, микросферы, нанокапсулы, пленки)

-инкапсулирование иммунных антигенов (можно добиться эффекта, как от множества вакцинаций)

-регенерация тканей (полимеры полилактоны и полигидроксиалканоаты являются замечательными стимуляторами роста и регенерации тканей. В настоящее время изучается механизм их действия на кожных культурах, на полых волокнах (регенерация сосудов), на культурах нервных тканей [88].

Хирургические шовные материалы. Хирургические шовные материалы необходимы при каждой хирургической операции: их применяют для сшивания различных тканей (кожи, костей, сосудов, нервов, сухожилий и др.), а также для остановки кровотечения. Шов с использованием химических и натуральных нитей традиционен и привычен, и пока является самым надежным способом в хирургии. Создание наиболее рационального шовного материала является остроактуальной проблемой. Особенно остро проблема шовных материалов стоит в России. Если по количеству ввозимых в нашу страну шовных материалов

потребности медицины удовлетворяются, то ассортимент шовных нитей, предлагаемых Российской промышленностью, намного хуже, чем за рубежом [89].

Раневые покрытия и материалы для временного замещения кожных покровов. Для изготовления пленочных материалов в основном используются полимеры, которые растворяются в различных растворителях, чаще всего используют полимеры на основе гликолида и лактида, причем процент лактида из-за его способности к растворению должен превышать 50%. Наиболее часто пленочные материалы получают методом полива из раствора. Метод формования полимерных материалов из растворов позволяет регулировать как их надмолекулярную, так и пористую структуру. Пленочные материалы могут применяться как покрытия на раны и ожоги, а также для операций на внутренних органах. Наибольший интерес для медицины представляют пленки с нанесенными на них различными лекарственными препаратами, белками и т.д. [89].

Учитывая, что в основе физиологии очищения ран лежат ферментативные процессы, поэтому на первой стадии течения раневого процесса - стадии очищения ран от гноя, обоснованным является использование протеолитических ферментов, которые при местном применении расщепляют девитализированные ткани, снижают вязкость раневого экссудата и облегчают его элиминацию. На второй стадии – стадии заживления ран обеспечиваются условия для прорастания новой ткани: фибробластов и эпителия [89].

Крепежные изделия. В настоящее время, при лечении сложных переломов костей в некоторых случаях используются крепежные изделия (штифты, винты и др.) из металла, керамики или других материалов. Для извлечения их из организма после сращения кости необходима повторная операция. Ее можно избежать, используя изделия из биодеструктурируемых полимеров, которые сохраняют свои прочностные характеристики на все время сращения перелома. В этом отношении перспективным полимером является поликапролактон [7].

Основными требованиями к каркасным материалам являются: биосовместимость, разлагаемость, остеопроводимость и механическая

целостность. Стратегия костной инженерии базируется на использовании натуральных и синтетических биodeградируемых материалов как каркасов для трансплантации клеток или как веществ, усиливающих регенерацию кости. На внутренней поверхности пор каркаса биodeградируемого материала, за время инкубирования при комнатной температуре, происходит образование и рост непрерывных минеральных карбонатных апатитов [7].

Системы с контролируемым выделением лекарственных соединений. В последние годы появилось новое направление в медицинском использовании биodeградируемых полиэфиров: создание полимерных систем с контролируемым выделением лекарственных соединений (т.н. «Controlled release systems»). Для этой цели в качестве матрицеобразующих полимеров применяют полилактид, полигликолид, поликапролактон и сополимеры на их основе. Это весьма перспективное направление предполагает использование полимерного материала в качестве носителя лекарственного вещества, способного к постепенному выделению активного начала, и биодеструкции полимера по окончании медикаментозного лечения. Основным предметом исследований в этой области является регулирование не только скорости биodeградации, но и кинетики выделения лекарственного препарата с целью обеспечения в очаге поражения его терапевтической концентрации в течение необходимого для лечения времени [7].

Микрокапсулированные формы биологически активных соединений. Микрокапсулирование является одним из способов так называемой “физической иммобилизации” физиологически активных соединений. При его реализации не образуется химических связей с материалом капсул. Этот факт приобретает большое значение, если капсулированию подвергаются физиологически активные вещества белковой природы, химическое модифицирование которых часто приводит к потере биологической активности. Микрокапсулирование нашло наибольшее практическое применение в фармацевтической промышленности для изготовления препаратов перорального назначения. Основными целями, достигаемыми микрокапсулированием оральных препаратов, являются маскировка запаха и вкуса тошнотворных лекарственных веществ (ампициллина, левомицитина, кофеина, клоксациллина натрия, тетрациклина, фенилбутазона,

рыбьего жира и др.), стабилизация от окисления (витаминов), превращение вязких жидкостей в сыпучие порошки (кукурузное масло, витамин Е, рыбий жир). Оболочка микрокапсул предотвращает негативное действие некоторых лекарств, которые могут вызвать раздражение или даже язву желудка [7].

В настоящее время растет интерес к использованию имплантатов из биodeградируемых полимеров как средств внутрицеребрального введения противораковых средств. В частности, были получены биodeградируемые микросферы, содержащие цисплатин, предназначенные для инъекционного введения непосредственно в участок мозга, пораженный опухолью. Лекарственный препарат *in vitro* высвобождается на 80 % через 30 дней. Для замедления скорости выделения лекарственного препарата использовали поливиниловый спирт и метилцеллюлозу [7].

Эндохирургия и тканевая инженерия. Перспективным направлением использования биodeградируемых полимеров является создание на их основе пористых материалов для заместительной хирургии. Установлено, что для прорастания фибробластов оптимальный размер пор должен составлять ~ 20 мкм, костной ткани – 100-250 мкм, для регенерации кожи – 20 - 125 мкм. Для регулирования пористой структуры имплантата используют различные методы. Регулированием макро- и микропористой структуры таких материалов могут быть получены эндопротезы костной, грануляционной тканей, а также искусственная кожа. После регенерации соответствующей ткани или по мере ее регенерации полимерный материал рассасывается, не оставляя никакого следа, а восстановленная ткань начинает выполнять свою биологическую функцию [7, 90].

В настоящее время сформировалась новая междисциплинарная область науки – тканевая инженерия, которая включает в себя принципы и методы, как инженерии, химии, физики, так и клеточной биологии. В основе тканевой инженерии лежит введение клеток в биорезорбируемые полимерные матрицы и дальнейшее образование сложных клеточных композиций, подобных ткани или органу, для дальнейшей трансплантации их пациенту взамен поврежденных или утраченных. Использование таких матриц позволяет обеспечить сохранение

исходного состояния межклеточных контактов и поверхностных рецепторов клетки при создании клеточных продуктов и их трансплантации. В зависимости от практических задач к таким полимерам предъявляется ряд требований, а именно, нетоксичность, биосовместимость, простота изготовления полимерных изделий и их достаточная механическая прочность, а также способность полимера резорбироваться в процессе восстановления структуры ткани. Размножение и рост клеток на полимерных матрицах с разной пространственной организацией может обеспечивать формирование структурной основы дифференцирующихся тканей [90].

Техника получения биоактивных имплантатов и биоискусственных органов включает: 1) изготовление биосовместимых и биоабсорбируемых конструкций (инкубаторов) для культивирования аутологических клеток пациента или клеток, взятых из банка, 2) выращивание клеток и формирование тканей *in vitro* и 3) последующую имплантацию полученных конструкций пациенту [7].

Одной из главных причин осложнений при использовании биodeградируемых материалов является воспалительная и аллергическая реакция организма на продукты деструкции материала и проявление канцерогенности. Тканевая инженерия ориентирована на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей. Материалы, применяемые в тканевой инженерии, должны обладать спектром специальных свойств. Прежде всего, продукты деградации материала не должны быть токсичными, конструкция должна сохранять свою форму и обладать достаточной прочностью до тех пор, пока новая ткань организма-хозяина в месте имплантации полностью не восстановится; материал, применяемый для изготовления конструкции, не должен быть иммуногенным, он должен поддерживать рост клеток и организацию их в ткань, в свою очередь, сам имплантат должен беспрепятственно отводить продукты обмена клеток [7].

### 1.3.1 Материалы медико-биологического назначения на основе полигидроксибутирата.

Благодаря своим уникальным свойствам микробиологический полигидроксибутират нашел применение во многих областях медицины и фармакологии, таких как, системы направленного и пролонгированного высвобождения биологически активных соединений (БАС). Подобные системы актуальны для применения в отношении лекарственных препаратов, лечебная эффективность которых находится в прямой зависимости от продолжительного воздействия на ткани и органы. Ярким примером таких БАС являются противораковые [91], психотропные [92], противотромбозные [93] и многие другие препараты.

В литературе широко представлены экспериментальные данные об успешных *in vitro* и *in vivo* исследованиях полимерных систем на основе ПГБ.

Микросферы, полученные на основе смеси полигидроксибутирата и фталатацетата целлюлозы, содержащие фторурацил были исследованы в работе [91]. С помощью электронной микроскопии установлено, что полученные сферы имеют пористую структуру и размеры от 29 до 67 мкм. ИК-спектроскопия подтвердила совместимость полимерной смеси, а также отсутствие взаимодействий препарат-полимер. Исследование кинетики высвобождения проводили в две стадии: при 37 °С в моделируемой буферной среде желудка (рН 1,2) в течение 2 ч, и в моделированной кишечной среде (рН 7,4). Установлено, что в отличие от микросфер из чистого ПГБ, высвобождение БАС в случае смеси полимеров является рН зависимым. Кроме того, применение композитных сфер повысило эффективность выделения препарата при рН 7.4. Это имеет первостепенную важность, так как всасывание фторурацила происходит в кишечнике [91].

Микросферы, полученные из чистого полигидроксибутирата, содержащие дипиридамола, препарат противотромбозного типа, был введен в микросферы из чистого ПГБ [93]. Сферы разного диаметра: 19, 63 и 92 мкм получали методом однократного эмульгирования. Анализ кинетических кривых контролируемого высвобождения лекарственного вещества в сочетании с измерением деструкции



полимера показал, что их кинетический профиль зависит от сочетания диффузионного процесса и гидролитической деструкции ПГБ. Диффузионно-кинетическое уравнение, описывающее линейную и нелинейную стадии высвобождения дипиридамола, представляет собой сумму двух слагаемых: десорбции из сферы по диффузионному механизму и высвобождения в результате реакции нулевого порядка соответственно. Линейный участок профиля высвобождения объяснен реакцией гидролиза [93].

Аналогичные результаты были зафиксированы в процессе исследования пленочных образцов из полигидроксибутирата, содержащих фурацилин. Кинетические кривые высвобождения фурацилина из образцов с различным содержанием препарата представляют комбинацию диффузионного и кинетического процессов. Такого рода результаты необходимы при дальнейшей разработке систем для высвобождения нескольких лекарственных веществ одновременно с целью достижения комбинированного физиологического эффекта воздействия на ткани и органы биологических систем [94].

В статье [95] представлены результаты исследования выделения антибиотика рифампицина из пленочных образцов, полученных из полигидроксибутирата. Содержание БАС составляло от 5 до 15%. Анализ кинетических кривых показал, что высвобождение рифампицина определяется суперпозицией двух процессов: собственно, его десорбцией по диффузионному механизму (нелинейный участок) и гидролитической деструкцией поли(3-гидроксибутирата) (протяженный линейный участок), отчетливо проявляющейся после завершения диффузионного этапа [95].

Очевидно, что динамика выделения БАС из пленок на основе полигидроксибутирата характеризуется течением двух процессов - диффузионного и кинетического [93- 96]. Это вполне согласуется с теоретическими прогнозами.

Интересный многообещающий пример применения полигидроксибутирата описан в статье [97]. Методом двойной эмульсии были получены пористые микросферы, которые впоследствии исследовали в качестве сорбента нитрохлорбензида. Сорбционная емкость нового материала составила 57,83 мг /

г при 30 ° С, при сравнительно не высокой удельной площади поверхности - 8,45 м<sup>2</sup> / г [97].

ПГБ и его сополимеры находят все новые области применения, так новым перспективным направлением оказалась область трансдермальных препаратов. Самым большим препятствием для разработки систем доставки лекарственных средств в этой области является наличие практически непроницаемого верхнего рогового слоя эпидермиса. Материалы, проникающие через кожу, должны иметь низкий молекулярный вес и быть липофильными. Существует много способов преодолеть барьер рогового слоя, и один из перспективных методов – использование микро- и наночастиц. В работе [98] представлены результаты исследования трансдермального проникновения микро/нанокапсул из сополимера ПГБ – со-ПГВ было изучено *in vivo*, на мышах. Результаты хромато-масс-спектрометрии показали, что проникновение капсул через кожу зависело от размера частиц. Данное исследование продемонстрировало, что, изменяя размер наночастиц, несущих лекарственные средства, можно регулировать глубину проникновения частиц и, следовательно, осуществлять целевую доставку лекарственных средств [98].

Широкое распространение ПГБ получил в таких областях как тканевая инженерия и эндопротезирование. Одна из основных задач этого направления является получение матрикса, сочетающего в себе физико-механические показатели, а также обладающего биосовместимостью и биodeградируемостью.

Одним из вариантов матрикса для остеогенеза является композитный материал, представляющий собой керамическую пористую матрицу со средним диаметром пор 100-400 мкм, из гидроксиапатита (ГА) покрытую ПГБ без использования токсичных органических растворителей [99-101]. ПГБ придает изделию необходимую прочность и упругость (прочность на сжатие и модуль упругости 1,46 и 21,27 МПа, соответственно), а также придает поверхности необходимую шероховатость, что способствует креплению клеток. Исследования *in vitro* показали, что образцы пригодны для закрепления и созревания живых клеток [102]. Также, матрикс ПГБ/ГА обладает необходимой биосовместимостью. В экспериментах [103] с имплантацией под кожу крыс

Вистар образцов ПГБ/ГА, имплантаты показали отличные результаты: отсутствие выраженных иммунной и воспалительной реакции, а также выраженного образования фиброзных капсул. На поверхности и внутри импланта отмечено формирование костной ткани. Однако, в ходе эксперимента в условиях замещения костной ткани имплантами в условиях живого организма, установлено, что образцы из чистого ПГБ дают лучшие результаты. За три месяца остаточный объем полимера составил 25%, а 75% занимает новообразованная костная ткань. В тех же условиях образец ПГБ/ГА показал остаточный объем импланта – 35% [103].

Прототипы матриц для энхирургии кости получают на основе композиционного материала ПГБ – биостекло (10%). Они обладают развитой (около 84%) системой сообщающихся пор диаметром 250-300 мкм, формирующихся в процессе выщелачивания. показал систему сообщающихся пор, имеют необходимую шероховатость поверхности. Результаты имплантации образцов в подкожное пространство крыс Вистар, свидетельствуют об отсутствии токсической и иммунной реакции, биологической активности и биосовместимости [104, 105].

Изделия на основе полигидроксибутирата нашли свое применение в тканевой инженерии, в качестве матрицы из нано-волокон для выращивания стволовых клеток, (нейронов). Наиболее эффективным, в части стимуляции роста и дифференциации клеток, выступают образцы полученные из сополимера полигидроксибутират- гидроксигексаноат [106].

ПГБ импланты могут применяться и в агрессивных средах организма, о чем свидетельствуют экспериментальные данные по нахождению стентов для желчеводящих путей в организме животного (собаки) в течение 100 суток. Патологий, воспалений и рубцовых явлений не выявлено, стенты сохранили физико-механические характеристики, следов кальцификации отсутствуют. К концу эксперимента, вследствие деструкции, наблюдалось снижение массы образцов на 30 % [103].

Полигидроксибутират используется не только для создания резорбируемых шовных нитей [107, 108.], но и для повышения совместимости не

рассасывающихся шовных нитей из традиционных полимеров. Для придания хирургическим нитям антимикробной активности и биосовместимости на плетёные полиэфирные нити наносили покрытие из ПГБ, содержащее антимикробное вещество фуразолидон [109]. Показано, что пролонгированный эффект действия фуразолидона (7-14 сут.) достигается двукратным нанесением покрытия в количестве 10% от массы нити, в состав которого входит 2-6% ФЗ. Показана возможность регулирования структуры покрытия и антимикробной активности нитей введением в него других биосовместимых и биodeградируемых полимеров [110].

### **1.3.2 Материалы медико-биологического назначения на основе поликапролактона**

Поликапролактон, благодаря таким свойствам как биосовместимость и способность полностью выводиться из организма после биорезорбции, подходит для получения систем с контролируемым высвобождением лекарственных веществ. Скорость биодеструкции ПКЛ достаточно низкая в сравнении с другими биополимерами, что делает поликапролактон наиболее подходящим для изготовления систем долгосрочного действия. Скорость высвобождения лекарственных соединений можно регулировать, применяя смеси полимеров [111-113].

В литературе широко представлены методы получения микросфер из ПКЛ [112]. Микросферы получают из мономера диспергированного в жидкости с последующей полимеризацией [114]. Микросферы формируются из масло растворимых мономеров эмульгированных в водной среде (система вода/масло В/М) или из водорастворимых мономеров, растворенных в воде эмульгированных в органическом растворителе (система масло/вода М/В). Полимеризация мономера осуществляется разными методами, в том числе эмульсия, суспензия и дисперсия [115]. Из эмульсии обычно получают сферы размерного ряда 10-100нм. В результате дисперсионной полимеризации получают микросферы с размерами в диапазоне 0.5-10 $\mu$ m. Реактивы (в том числе мономер, инициатор и стабилизатор), растворяют в органической среде, и полимеризация происходит внутри капель раствора. Полученные полимерные сферы, нерастворимые в

органическом растворителе, осаждаются [24]. Благодаря отсутствию токсичных растворителей, особый интерес представляет метод полимеризации в сверхкритическом CO<sub>2</sub>. [116, 117].

Суспензионной полимеризацией обычно получают микросферы с размерами 50-500мкм. В суспензионной полимеризации мономер диспергируют со стабилизатором в водной фазе, инициатор растворяют в мономерной фазе, где и происходит полимеризация. Размер и количество частиц определяется размером и количеством дисперсных капель мономера и скоростью механического перемешивания [115].

Метод испарения растворителя [также известный как техника двойной эмульсии) и метод распылительной сушки используются для получения микросфер из линейных полимеров [118]. Микросферы получают путем испарения органического растворителя из дисперсных капель, содержащих полимер и биологически активное соединение [119].

Основной проблемой при использовании данного метода является диффузия БАС из микросфер в процессе получения.

Наносферы содержащие лекарственные соединения получают в диапазоне размеров 10-1000 нм. БАС могут быть инкапсулированы, диспергированны или адсорбированы в теле капсулы. В зависимости от локализации лекарственного соединения их называют нанокапсулы или наносферы. Методы получения нанокапсул и наносфер такие же, как микросфер и микрокапсул, с изменением параметров процесса направленных на получение частиц определенного размера. Это достигается с помощью малого отношения объемов дисперсной фазы к дисперсионной среде и более высоких скоростей перемешивания [120].

В литературе описаны раневые покрытия в виде ультратонкой пленки из ПКЛ [121] и пленки содержащей антисептик хлоргексидин [122]. Джонс и др в работе [123] исследовали смеси ПКЛ с полимерным антимикробным комплексом - поливинилпирролидонйодидом. Они продемонстрировали связь между скоростью разложения полимера и устойчивостью к образованию корки (деградация была рассчитана с помощью изменения от высокого к низкому молекулярному весу ПКЛ в полимерных смесях) [123].

Весьма перспективен ПКЛ для применения в качестве биоразлагаемой биосовместимой матрицы для контрацептивов, имплантируемых подкожно. Одобрение FDA и низкая скорость деградации, а также отсутствие необходимости повторной операции делают поликапролактон весьма перспективным материалом. В работах [124-126] описаны характеристики микросфер, содержащих противозачаточные гормоны в качестве инъекционного импланта. Сан и др. в работе описывают противозачаточный препарат на основе поликапролактона со сроком действия два года, который был одобрен для второй фазы кинических исследований в Китае [42].

В литературе мало работ, посвященных исследованию фиксирующих устройств для применения при переломах из чистого ПКЛ. Те немногие исследования, которые представлены, свидетельствуют о недостаточной прочности полученных изделий, даже армированных стекловолокном [127]. Однако, в последние 10 лет, было найдено особенно удачное сочетание композиционного материала в виде матрицы из поликапролактона покрытого гидроксиапатитом. Подобные композиты обладают необходимой прочностью и адгезионными свойствами поверхности, что делает их весьма перспективными для применения в заместительной хирургии, для костных тканей [128-132].

В работе Алани и др. представлены результаты исследования композиты на основе ПКЛ с содержанием различных ионов в качестве пломбировочного материала для каналов. Наилучшие результаты показал композиционный материал поликапролактон-фосфат [133].

### **1.3.3 Методы получения пористых материалов для биотехнологии и тканевой инженерии.**

Как уже отмечалось, для лечения или временного замещения поврежденной ткани в организме, а также обеспечения механической поддержки растущим клеткам в биотехнологии и тканевой инженерии используются биодеградируемые матриксы - биоразлагаемые полимерные пористые материалы определенной формы и размера. В теле матрикса могут быть диспергированы биологически активные соединения, например стимуляторы роста или антибиотики [134, 135,136].

Широкопористые материалы выполняют роль каркаса обеспечивающего поверхность для адгезии и роста клеток, который должен постепенно замещаться формирующимися из этих клеток живыми тканями. Кроме того система сообщающихся пор необходима для интенсификации массопереноса при использовании материала в качестве биосорбента в процессах детоксикации организма или системы контролируемого выделения лекарственного вещества.

Существует целый ряд методов, позволяющих увеличить удельную поверхность полимерного материала, но не все из них пригодны для получения биополимерных материалов.

Матрицы оцениваются по таким параметрам как морфология, пористость, механические свойства, скорость выведения БАС, клеточная совместимость и обеспечение пролиферации и дифференцирования клеток. В числе полимеров применяемых для изготовления матриц для тканевой инженерии, поликапролактон и сополимеры на его основе занимают значительное место и достаточно широко изучены [137]. В настоящее время, матрицы на основе ПКЛ используются предпочтительно в объемной культивации клеток. Например, скафолды из поликапролактона применяются при культивировании раковой ткани, необходимой для исследования патогенных клеток и разработки новых методов лечения онкологических больных [138,139]. Главным достоинством ПКЛ и ПГБ является способность матриц на его основе удерживать заданную форму более месяца.

Существуют различные методы получения пористых матриц на основе ПКЛ и ПГБ.

## Метод формования в присутствии порообразователей с последующим их удалением промывкой



Рисунок 4 – Схема получения пористого матрикса с применением порообразователей.

Данным методом получали матриксы для последующей культивации человеческих остеобластов [140]. По результатам исследований экспрессии рецептора VEGF-2, фактора Виллебранда и формирования эндотелиальных клеток, установлено, что максимальная биосовместимость наблюдается у композитов ПКЛ в сочетании с гидроксиапатитом. Также экспериментально установлена оптимальная доза TGF -  $\beta 1$  для индукции кальцификации остеобластов. В тоже время отмечено, что в присутствии дексаметазона TGF -  $\beta 1$  выступает в качестве ингибитора кальцификации [141,142].

В работе [143] исследована индукция ангиогенеза (процесса образования новых кровеносных сосудов) в присутствии VEGF и гепарина. При покрытии гепарином поверхности ПКЛ матрикса содержащего связанный VEGF, инфильтрации кровеносных сосудов резко возрастает. Установлено, что ангиогенез находится в прямой зависимости от количества VEGF, а введение гепарина дает синергетический эффект *in vivo*.

Исследование влияния плотности посева и полимерной композиции на рост клеток костной ткани, были представлены в работе [144]. Посевы с различной плотностью культивировали 3 и 6 недель. Влияние плотности посева на образование ткани оказалось не значительным, кроме того обнаружена задержка минерализации. В другом исследовании матрикс в виде гидроксиапатита покрытого пленкой ПКЛ, изготовленного методом УФ-сшивки и выщелачивания



порогена, показал лучшую клеточную пролиферацию чем композит ПКЛ - гидроксиапатит [145].

### Метод получения нетканых или тканых волокнистых матриц

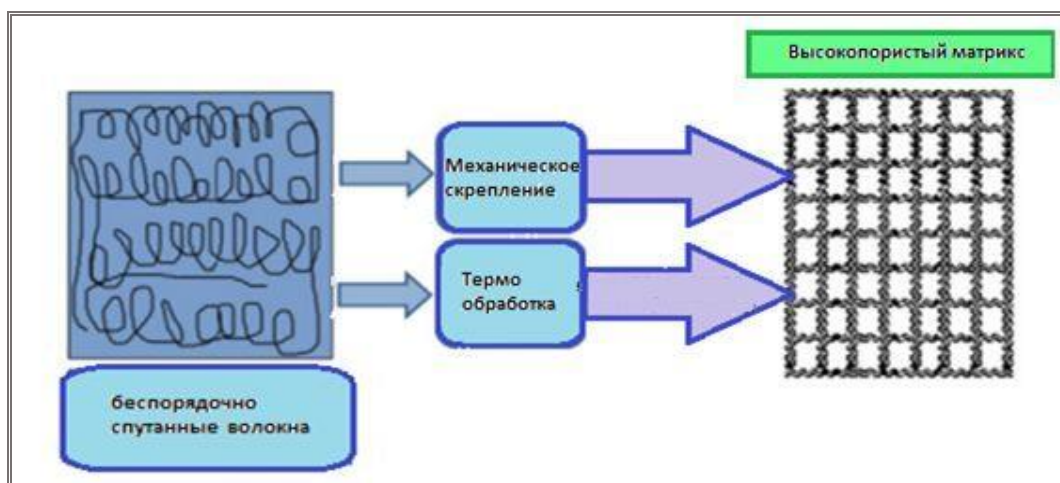


Рисунок 5 – Схема получения высокопористого матрикса из волокнистой основы.

В литературе представлены данные о исследованиях таких матриц после специфической функционализации, которая приводит к улучшенной пролиферации клеток сосудистой ткани, а также о результатах изучения влияния полимерной композиции. Суть функционализации состоит в предварительной обработке путем закрепления человеческих кожных микро-сосудистых эндотелиальных клеток [139, 146, 147]. Установлено, что подобная функционализация ингибирует пролиферацию клеток гладких мышц и снижает адгезию тромбоцитов, что делает такую обработку направленно-подходящей для сердечно-сосудистых имплантатов. В другой работе, ПКЛ-колагеновый матрикс исследован на предмет сосудистой реконструкции. На поверхности матриц наблюдалось присоединению и рост сосудистых клеток, также была отмечена выраженная сопротивляемость присоединению тромбоцитов, кроме того опытные образцы сохранили свою структурную целостность в течение 1 месяца. Подобные свойства аналогичны особенностям природной артерии, что делает такие матрицы перспективными для применения в сосудистой трансплантации. Матрицы на основе другого композита – ПКЛ-крахмал, также подвергнутые обработки с

закреплением эндотелиальных клеток показали формирование сосудистой структуры в течение 21 дня [146, 147].

В других работах [148, 149] приведены данные по результатам исследований волокнистых матриц из ПКЛ на предмет аксиональной инфильтрации и воспалительной реакции в условиях живого организма (имплантация в кору спинного мозга крыс). Остаточная воспалительная реакция присутствовала в течение 60 дней после пика в течение недели, однако образцы показали совместимость, а высокая пористость матриц способствовала инфильтрации нейронов, что делает их подходящими для нейронной регенерации и инженерии нервных тканей [148, 149].

Также, хорошие результаты показали такие матрицы в опытах по культивации дермальных фибробластов [150], регенерации и культивации костной ткани [151- 153].

#### Создание пористой морфологии путем вспенивания газом.

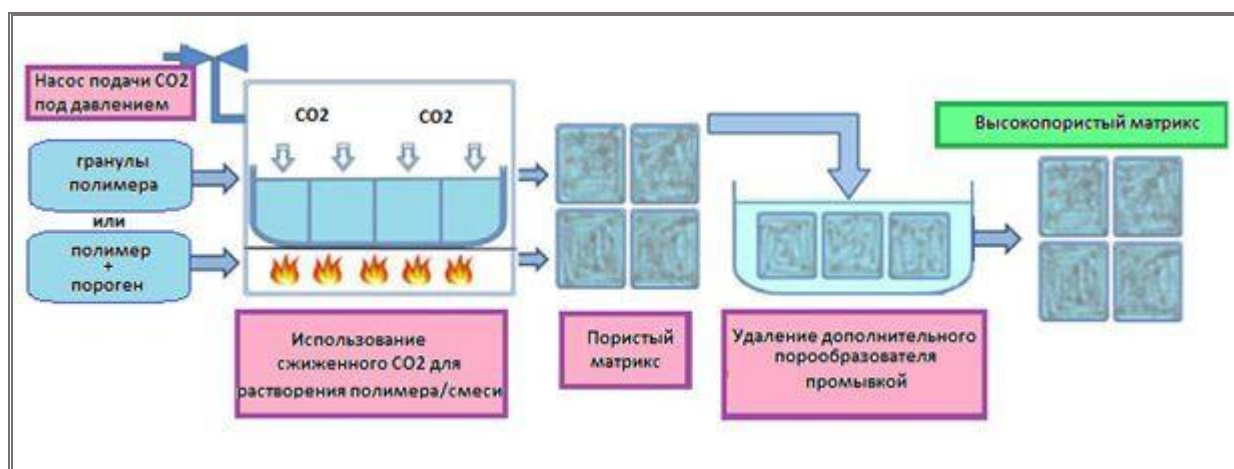


Рисунок 6 – Схема получения высокопористого матрикса с применением сжиженного CO<sub>2</sub>.

Данный метод позволяет получать поры заданной величины в интервале от 0 до 300 мкм. В работе [154] матрицы, полученные методом вспенивания с пористостью 0,54%, были исследованы с целью исправления дефекта черепа и изучения остеогенного дифференцирования стволовых клеток. В работе отмечено влияние условий на процесс культивации, а именно в динамических условиях была отмечена более высокая минерализация [154].

### Сублимационная сушка:

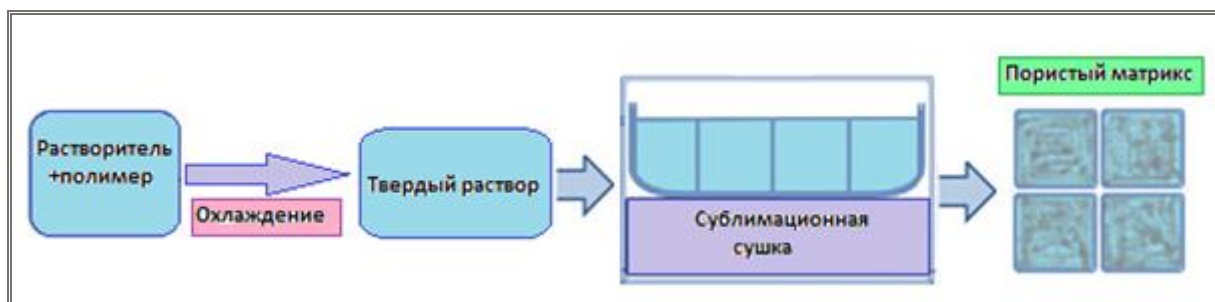


Рисунок 7 – Схема получения пористого матрикса с применением сублимационной сушки.

В работе [155] исследованы условия получения, а именно путем изменения концентрации полимера в растворе, был получен материал с размерами пор 90-100мкм и степенью пористости 74,4%. Матрикс с подобными характеристиками перспективен для регенерации тканей связок [155].

В работах [156, 157] приведены данные по модификации полимера с целью получения оптимальных свойств для применения при культивации костной и хрящевой ткани. Матрикс состава ПКЛ-поливиниловый спирт с соотношением 50/50 имеют оптимальные механические свойства и адгезию. Экспериментально это подтверждено на примере культивации хондроцитов свиньи. Отмечено, что образцы сохраняли механическую стабильность в течение месяца [156, 157].

### Экструзия в присутствии или отсутствие растворителя.



Рисунок 8 – Схема получения пористого матрикса экструзией.

Данный метод интересен возможностью получения матриксов сложного состава, путем введения различных компонентов в формовочную смесь, например лекарственных ранозаживляющих препаратов, таких как сульфат гентомицина

[158] или второго полимера, позволяющего модифицировать свойства биodeградируемого полиэфира [159,160].

### **1.3.4 Получение материалов из смесей биodeградируемых полимеров**

Известны различные методы модификации свойств полимерного материала: введение низкомолекулярных компонентов, сополимеризация, и многие другие. Одним из методов направленного регулирования свойств получаемого материала, является формирование из смеси полимеров.

Основным фактором, определяющим тип смеси полимеров является их совместимость [161]. Совместимостью называют взаимную растворимость полимеров на молекулярном уровне [162]. Совместимость среди высокомолекулярных соединений очень редкое явление [19]. Полигидроксibuтират является не совместимым с такими биополимерами, как, полилактид [163, 164]. А вот с полиэтиленгликолем [163] дает совместимую гомогенную систему. В литературе содержатся противоречивые данные о совместимости ПГБ с поликапролактоном от несовместимости [165] до формирования смесей с одной температурой стеклования [166].

Для смеси ПГБ/ПЛ характерно наличие кристаллических и аморфных областей, ПГБ кристаллизуется во всех смесях. Однако, соотношение компонентов оказывает влияние на механизм кристаллизации. При низком содержании ПГБ, в процессе кристаллизации, формируется интересная структура, полигидроксibuтират образует небольшие тонкодисперсные кристаллы, которые как отмечается в работе [164] могут выступать в роли зародышей кристаллизации ПЛ.

В смеси полимеров может наблюдаться синергия свойств. Так, например, в смеси полигидроксibuтират/полиэтилентерифталат наблюдается увеличение термической стабильности [167]. А в системе полигидроксibuтирата-полипропиленгликоль (ППГ) последний выступает в роли пластификатора. Максимальный пластифицирующий эффект наблюдается в смеси с содержанием ППГ – 30% массовых. Однако было отмечено, что присутствие второго компонента существенно снижает скорость биodeградации образцов [168]. При

смешении полимеров могут наблюдаться самые неожиданные, иногда, уникальные свойства. Так, например, при получении пленок из раствора смеси полимеров ПГБ/ПКЛ в соотношении 50/50 отмечено формирование пористой структуры, без введения дополнительных порообразующих компонентов [165,169]. Это связано с тем, что в процессе испарения растворителя в системе существуют две равновесные жидкие фазы с различным содержанием полимеров.

В основном создание композитов биodeградируемых полиэфигов проводится с целью изменения механических свойств, увеличения гидрофильности полимера и увеличения скорости его биodeградации.

Сополимеры, например, сополимеры лактида с капролактоном [170], и смеси, такие как ПЛ - ПГБ, ПЛ - крахмал, ПГБ - крахмал, ПЛ - ПКЛ, ПГБ - ПКЛ, ПЛ - полиэтиленоксид, ПЛ - поливинилацетат, ПЛ - полиэтиленгликоль обладают улучшенными рабочими характеристиками, такими как проницаемость, термическими и механическими свойствами [171,172].

Способность к переработке полигидроксиалканоатов улучшается при смешивании с другими полимерами, такими как полилактид и ПКЛ вследствие повышения прядомости - устойчивости струи расплава, улучшения реологических свойств смеси и снижения остаточной липкости. Эти новые свойства расширяют спектр возможных методов для ПГБ, включая получение пленок и других изделий из расплава [172-175].

Смешение биополимеров обладающих высокой жесткостью, например, ПГБ или полилактида с другим полимером, обладающим высокой гибкостью, например ПКЛ или сополимером ПГБ-ПГВ, может дать смесь с характеристиками лучшими, чем у чистых полимеров [173]. В работе [173] показано, что для достижения максимальной эффективности содержание жесткого полимера должно составлять от 70 до 95 массовых процента. При таком составе прочность жесткого полимера сохраняется на фоне увеличения удлинения от 100% до 1000%. Такой эффект был достигнут для смеси 80% полиэфира Биомакс (модифицированного полиэтилентерефталата фирмы Дюпон) и 80% гибкого Экофлекс [173].

ПГБ и его сополимер с гидроксивалериатом становятся непрозрачными при содержании второго полимера более 20-30% [176]. Это свидетельствует о фазовом разделении в смеси вследствие отсутствия совместимости компонентов смеси.

Для улучшения свойств биоматериалов предложены различные варианты получения полимерных смесей. Например, в качестве недорогой альтернативы биodeградируемого полимерного материала была предложена смесь биоразлагаемого алифатического полиэфира получаемого по реакции поликонденсации этиленгликоля/1,4-бутандиола и янтарной кислоты/адипиновой кислоты, с многотоннажным полимером, таким как полиэтилен [177]. В результате была получена смесь, где с увеличением содержания полиэфира прочность и модуль упругости возрастают, а прочность на изгиб и модуль упругости при изгибе уменьшаются [177].

Смеси полилактида и ПГБ представляют значительный интерес, обусловленный биodeградируемостью обоих полимеров, а также коммерческий интерес с точки зрения относительно меньшей стоимости материала с небольшими сроками биоразложения [170,171,178-181]. ПГБ и ПЛ образуют частично совместимую смесь, когда молекулярный вес полилактида менее 20 кДа, при более высоких значениях Мм смесь не совместима [183,183].

Методика получения пленок из смеси полимеров также влияет на совместимость полученного материала. Так, например, если формование из раствора дает несовместимые смеси, то при получении пленок из расплава тех же полимеров получены данные, свидетельствующие о их частичной совместимости [184].

Из смеси ПГБ и полилактида получают материал с более высокой скоростью деструкции, при этом ПЛ обеспечивает дополнительную прочность и меньшую липкость в процессе переработки [173,174]. Более высокая скорость деградации ПГБ облегчает процесс деструкции полилактида, создавая пористую структуру и облегчая проникновение влаги и других способствующих биодеструкции соединений внутрь [174].

В [174,176] показано, что при содержании ПГБ мене 10 массовых %, пленки все еще остаются слишком хрупкими для использования, а при содержании более 50% пленка теряет свою прозрачность из-за высокой кристалличности ПГБ.

Смешение жесткого полилактида с более пластичным сополимером гидроксibuтирата с гидроксигексаноатом позволяет улучшить свойства чистых полимеров, в том числе гибкость, прозрачность, упругость, пластичность и технологичность процесса переработки [174]. Например, энергия разрушения материала увеличивается с 0,21Н\*м для чистого полилактида до 2,0 Н\*м для смеси, содержащей 10% сополимера, а удлинение при разрыве возрастает с 5% до 100% [174].

В смеси полилактида с ПГБ-ПГВ энергия разрыва и удлинение возрастают незначительно: (0,21 и 5% для чистого ПЛ) и (0.32 н\*м и 6,2%) для смеси полилактида с ПГБ [181].

Эти результаты весьма специфичны именно для исследованных образцов сополимеров, и оптимальные соотношения лактида и ПГБ или его сополимеров используемых для получения конкретных смесей, будут определяться молекулярной массой полилактида, молекулярной массой сомономера, и содержания в нем звеньев ПГБ [176].

Интересной смесовой системой является композит бактериального высокомолекулярного (>100 кДа) ПГБ с химически синтезируемым аморфным низкомолекулярным (10 кДа) атактическим ПГБ (атПОб). Полученные композиты обладали большей эластичностью и большей скоростью биodeградации. Авторы объясняют эти различия значительным снижением общей кристалличности композита (с 70% у ПГБ до 40% у композита) и увеличением в нем количества аморфных областей [185,186].

Наибольшее количество работ посвящено разработке и изучению композитов ПГБ с другими наиболее распространенными биоразлагаемыми полимерами – полилактидами и полигликолидами [187,188]. При создании этих композитов также в ряде случаев использовали ПГБ. Так, полученный композит полилактида с ПОб имел меньшую кристалличность, улучшенные механические свойства и большую скорость биodeградации [187]. Были получены и исследованы

композиты бактериального ПГБ с полимолочной кислотой и показано, что они имеют улучшенные механические свойства [189].

Создание композита ПГБ с гидрофильным полимером, поливиниловым спиртом, позволило регулировать проницаемость для воды этого материала путём изменения содержания в композите поливинилового спирта от 0 до 20% (вес/вес) [190].

В работах А.Л. Иорданского и Ю.Н. Панковой разработаны технологические принципы получения пленок смесевых композиций ПГБ и сополимера полиамида 54С (ПА54С) как из расплава прессованием, так и из раствора последовательным испарением комбинации растворителей (хлороформ, диоксан, этиловый спирт). Практически все образцы пленок, полученных испарением растворителей, имеют достаточно развитую структуру микропор [191]. Испарение растворителя с достаточно умеренной скоростью в течение 3х – 4х суток приводит к образованию не сквозных микропор округлой формы и достаточно рельефную поверхность. В работе дан численный анализ распределения пор по размерам диаметра [191]. Как показывает это распределение, в полимерных матрицах преобладают поры размером 5 мкм [191].

Показана принципиальная возможность использования этих смесей в качестве матриц для длительной (более месяца) контролируемой доставки модельного лекарственного вещества (антисептика - фурацилина) с постоянной и регулируемой скоростью высвобождения. Методом ИК-фурье спектроскопии показано, что диффузионный процесс в композициях ПГБ-ПА54С различного состава контролируется взаимодействием полимерных компонентов путем образования водородных связей. Установлена совместимость полимерных компонентов в аморфной фазе и их взаимное влияние в процессах кристаллизации и плавления. Количественный анализ диффузии и сорбции воды в смесевых композициях ПГБ-ПА54С различного состава свидетельствует о том что, диффузионная подвижности воды экспоненциально возрастает с содержанием в системе более гидрофильного компонента – полиамида [192,193].

Помимо ПГБ, сополимеров ПГБ и полилактидов, ряд других полимеров были использованы для создания композитов с ПГБ: поли(пара-диоксанон),



поликапролактон [171, 188], полиэтилен, полиамиды, ацетобутират целлюлозы, коллаген и даже пищевые белки сои. Таким образом, создание композитов биodeградируемых полимеров значительно расширяет возможности применения биополимерных систем на основе ПГБ [194].

## 2. Результаты и обсуждение

Как было показано в литературном обзоре, полигидроксибутират и поликапролактон имеют перспективы использования в качестве пленко- и волокнообразующих полимеров, и компонентов полимерных систем, используемых для создания материалов для медицины и биотехнологии. На этапе разработки процесса получения на основе биodeградируемых полимеров пленок - медицинского назначения должна быть решена проблема направленного регулирования основных характеристик структуры пленки.

Эффективным способом регулирования надмолекулярной, морфологической и пористой структуры пленочных материалов является использование смесей пленкообразующих полимеров [195]. Достижимый при этом результат определяется как химической природой компонентов смеси и связанной с ней их термодинамической и кинетической совместимостью, так и их соотношением в композиции. Поэтому определение этих характеристик, установление взаимосвязи между составом композиции, структурой и свойствами пленки на основе полигидроксибутирата, является основой выбора параметров как стадии технологического процесса приготовления формовочной композиции, так и процесса формования пленок.

### 2.1 Изучение полимерных систем на основе смеси полигидроксибутирата и поликапролактона

С целью регулирования структуры полимерных биodeградируемых материалов были изучены полимерные системы на основе ПКЛ и ПГБ. Длительные сроки биодеструкции ПКЛ и ПГБ создают предпосылки для применения материалов на их основе для замещения тканей организма, создания эндопротезов, штифтов и т.п. Продуктами биодеструкции этих полимеров являются естественные метаболиты  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , поэтому исследуемые полимеры не оказывают токсического действия на организм и могут быть использованы в качестве биосовместимых биологически активных раневых покрытий и других систем с контролируемым выделением лекарственных соединений.

### 2.1.1 Анализ совместимости полигидроксибутирата и поликапролактона

Полимерные волокна и плёнки с заранее заданными свойствами могут быть получены путём синтеза новых плёноч- или волокнообразующих полимеров или путём модификации свойств уже существующих полимеров. Одним из методов модификации полимеров является получение смеси полимеров различной химической природы.

Основным фактором, оказывающим определяющее влияние на состояние подобных систем, является совместимость полимеров [195] Под совместимостью понимают полную взаимную растворимость полимеров на молекулярном уровне [196]. Экспериментальные данные показывают, что совместимость среди полимеров наблюдается крайне редко, даже несмотря на наличие общего растворителя [161]. Редкость данного явления также подтверждается термодинамикой. Изменение свободной энергии в результате смешения полимеров

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

должно быть отрицательным ( $\Delta G < 0$ ). А так как энергия смешения обычно очень мала, а  $\Delta H$  положительная величина, совместимость в системах полимеров действительно наблюдается очень редко.

В настоящее время существует несколько теорий растворов, применяемых к растворам полимеров [195,196].

Для оценки совместимости ПГБ и ПКЛ был использован метод, основанный на теории Флори-Хаггинса, позволяющей рассчитать параметр взаимодействия  $\chi$  полимеров через параметры растворимости:

$$\delta = \rho \Sigma F_i / M \quad (10)$$

где  $\rho$  - плотность полимеров,  $M$ - молекулярная масса повторяющегося звена,  $\Sigma F_i$

- сумма всех молекулярных констант притяжения химических групп в повторяющемся звене полимера.

$$\chi_{12} = \frac{V_r}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (11)$$

где  $\chi_{AB}$  - параметр взаимодействия полимеров,  $V_r$  - сравнительный объем, который выбирается как можно ближе к мольному объему наименьшего повторяющегося звена полимера,  $T$  - абсолютная температура,  $\delta_1$  и  $\delta_2$  - параметры растворимости полимеров.

Рассчитанное значение параметра взаимодействия сравнивается с критическим параметром взаимодействия:

$$(\chi_{12})_{кр} = \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{(x_1)^{1/2}} + \frac{1}{(x_2)^{1/2}} \right]^2 \quad (12)$$

где,  $x_1$  и  $x_2$  - степени полимеризации полимеров.

Если  $\chi_{AB} > (\chi_{AB})_{кр}$ , то полимеры должны быть несовместимыми при определенных соотношениях. Чем больше разница между этими двумя значениями, тем меньше область составов, в которой данные полимеры будут совмещаться.

В таблице 4 приведены данные, используемые для расчета параметров растворимости и оценки совместимости ПКЛ и ПГБ. Расчет параметров взаимодействия был выполнен по методу [165] с использованием таблиц Смолла.

Таблица 4 - Параметры, используемые для оценки совместимости ПКЛ и ПГБ.

Полимер	Степень полимеризации	Мм элементарного звена, Да	Плотность, г/см <sup>3</sup>	$\Sigma Fi$ , кДж·моль/см <sup>3</sup>	Параметр растворимости, $\delta$	$\chi_{12}$	$(\chi_{12})_{кр}$
ПКЛ	500	114	1,10	4079.4	39,33	0,0012	0,0019
ПГБ	3500	86	1,20	2866.0	39,71		

Использовались следующие значения:  $T=298K$ ,  $R=1,987$  кДж·моль<sup>-1</sup>·град<sup>-1</sup>,  $V_r= 100$  см<sup>3</sup>/моль, при этом уравнение для расчета  $\chi_{12}$  приобретает вид:

$$\chi_{12} = \frac{(\delta_1 - \delta_2)^2}{6} \quad (13)$$

Полученные значения параметра взаимодействия ПГБ и ПКЛ  $\chi_{12} = 0,0012$  положительно и близко к нулю и не превышает значение  $(\chi_{12})_{кр}$ , которое равно 0,0019, что указывает на возможную совместимость этой пары полимеров. Однако, принимая во внимание, что как ПГБ, так и ПКЛ являются кристаллизующимися полимерами, ожидать полной совместимости нельзя. Тем не менее, ПГБ и ПКЛ имеют общие растворители, в частности, хлороформ, и

поэтому независимо от несовместимости двух полимеров всегда можно получить разбавленный раствор, содержащий оба эти полимера [165, 166].

### 2.1.2 Изучение вязкости разбавленных растворов ПГБ и ПКЛ

При переработке полимеров из растворов природа растворителя оказывает существенное влияние на характер взаимодействия в растворе. Структура полимерных материалов, полученных из растворов полимеров, зависит от термодинамического сродства растворителя к полимеру, скорости испарения растворителя ( $T_{кип}$ ) и времени его испарения (давления пара растворителя над пленкой при ее формировании, толщины пленки). Целесообразным поэтому является изучение влияния природы растворителя на структурообразование в растворе, в том числе в процессе испарения растворителя.

Зависимость вязкости от концентрации разбавленного раствора описывается известным уравнением:

$$\eta_{уд}/C = [\eta] + K \cdot [\eta]^2 C \quad (14)$$

где,  $\eta_{уд}/C$  – приведенная вязкость,  $[\eta]$  – характеристическая вязкость,  $K$  – константа Хаггинса.

Была исследована концентрационная зависимость приведенной вязкости ПГБ и ПКЛ в двух общих для них растворителях: метиленхлориде и хлороформе (рисунки 9 - 11, таблица 5).

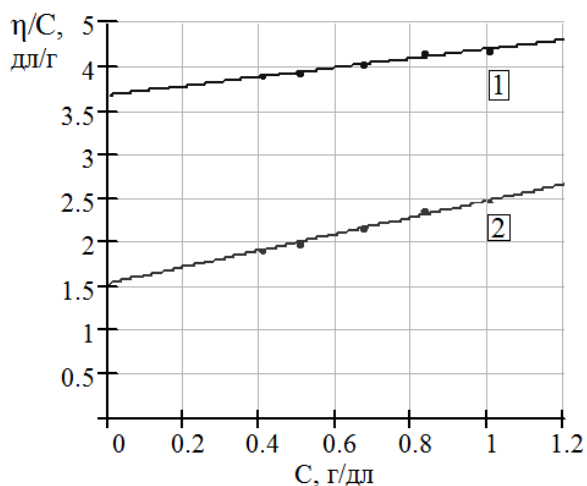


Рисунок 9 - Концентрационная зависимость приведенной вязкости раствора ПКЛ. 1 – раствор ПКЛ в метиленхлориде; 2 – раствор ПКЛ в хлороформе

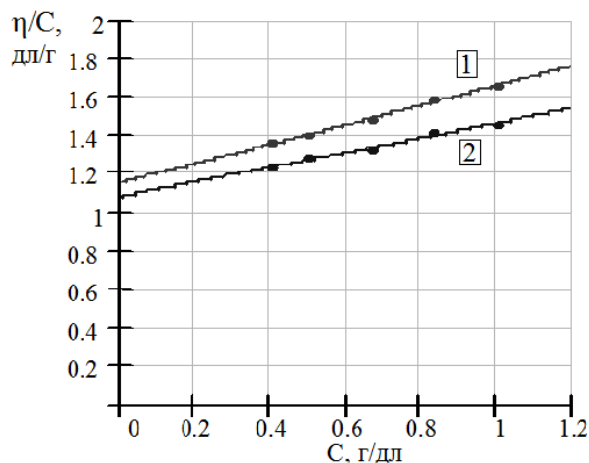


Рисунок 10- Концентрационная зависимость приведенной вязкости раствора ПГБ (300 кДа). 1 – раствор ПГБ (300кДа) в метиленхлориде, 2 – раствор ПГБ (300кДа) в хлороформе

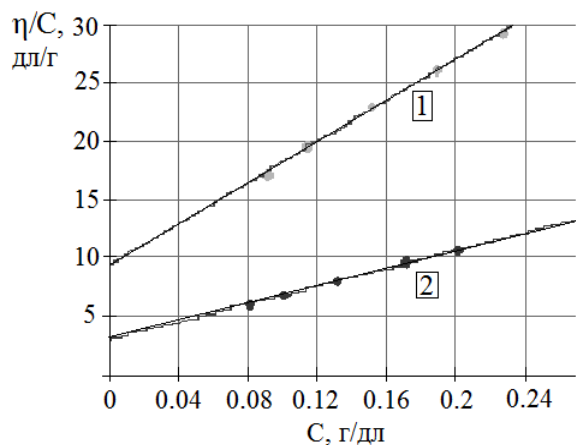


Рисунок 11 - Концентрационная зависимость приведенной вязкости раствора ПГБ (980 кДа). 1 – раствор ПГБ (980кДа) в метиленхлориде; 2 – раствор ПГБ (980кДа) в хлороформе.

Угол наклона прямых зависимости  $\eta_{уд}/C = f(C)$  для растворов полимера с близкими значениями характеристической вязкости зависит от величины константы  $K$ , которая характеризует взаимодействие полимера с растворителем. Ее величина определяется природой растворителя и постоянна для данной системы полимер-растворитель. Чем ниже константа  $K$ , тем выше сродство растворителя к полимеру. Согласно полученным данным (рисунок 9), несколько больший наклон прямой для раствора ПКЛ в хлороформе свидетельствует о меньшем термодинамическом сродстве этого растворителя к полимеру. Константа Хаггинса для раствора ПКЛ в хлороформе равная 0,40, больше константы Хаггинса в метиленхлориде, равной 0,34 (таблица 5).

Таблица 5 - Характеристика разбавленных растворов ПКЛ и ПГБ.

Полимер	ММ, кДа	Растворитель	Приведенная вязкость, дл/г	Константа Хаггинса
ПКЛ	50	хлороформ	1,15	0,40
ПКЛ	50	метиленхлорид	1,10	0,34
ПГБ	300	хлороформ	1,50	0,44
ПГБ	300	метиленхлорид	3,7	0,04
ПГБ	980	хлороформ	3,00	4,37
ПГБ	980	метиленхлорид	9,42	1,00

Характеристическая вязкость раствора ПГБ с молекулярной массой 300 кДа в метиленхлориде существенно выше, чем вязкость в хлороформе (рисунок 10), а ее зависимость от концентрации слабее. Увеличение молекулярной массы ПГБ до 980 кДа привело к смещению области линейной зависимости  $\eta_{уд}/C = f(C)$  в область меньших концентраций и закономерному увеличению значений  $[\eta]$  как в

метиленхлориде, так и в хлороформе (рисунок 11, таблица 5). Величина константы Хаггинса для растворов ПГБ с молекулярной массой 300 кДа и 980 кДа в метиленхлориде ниже, чем в хлороформе. Особенно это характерно для ПГБ с меньшей молекулярной массой: рассчитанное значение константы Хаггинса для раствора ПГБ (300 кДа) в хлороформе равно 0,44, что на порядок больше, чем константа Хаггинса в метиленхлориде, равная 0,038 (таблица 5). Следовательно, также, как и для ПКЛ для ПГБ метиленхлорид является термодинамически лучшим растворителем, чем хлороформ. Макромолекулы ПГБ в метиленхлориде имеют более развернутую конформацию, а межмолекулярные взаимодействия в растворе сильнее [162].

Наравне с расчетными методами существуют опытные пути определения совместимости полимеров. При экспериментальном изучении смесей полимеров необходимо отметить сохранение аддитивности вязкостных свойств в растворах смесей в случае совместимости полимеров. Были изучены зависимости вязкости смешанных растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе от состава смеси, рисунок 12.

Аддитивная зависимость логарифмической вязкости от массовых долей  $\omega_i$  компонентов смеси описывается уравнением:

$$\lg \eta = \omega_1 \lg \eta_1 + \omega_2 \lg \eta_2 \quad (15)$$

где  $\eta$ ,  $\eta_1$  и  $\eta_2$  вязкости эквипонцентрированного смешанного раствора полимеров, раствора полимера 1 и полимера 2 в общем растворителе. Для смешанного раствора ПГБ и ПКЛ в хлороформе ( $C=1$  г/дл) эта теоретическая зависимость в полулогарифмических координатах представлена на рисунке 8. Согласно экспериментальным данным вязкость меняется по кривой выше аддитивной, что характерно для смесей с большим взаимодействием между разнородными компонентами, чем в смешиваемых жидкостях, и образующихся с уменьшением объема [197]. Этот факт указывает на вероятность фазового разделения при удалении растворителя [165].

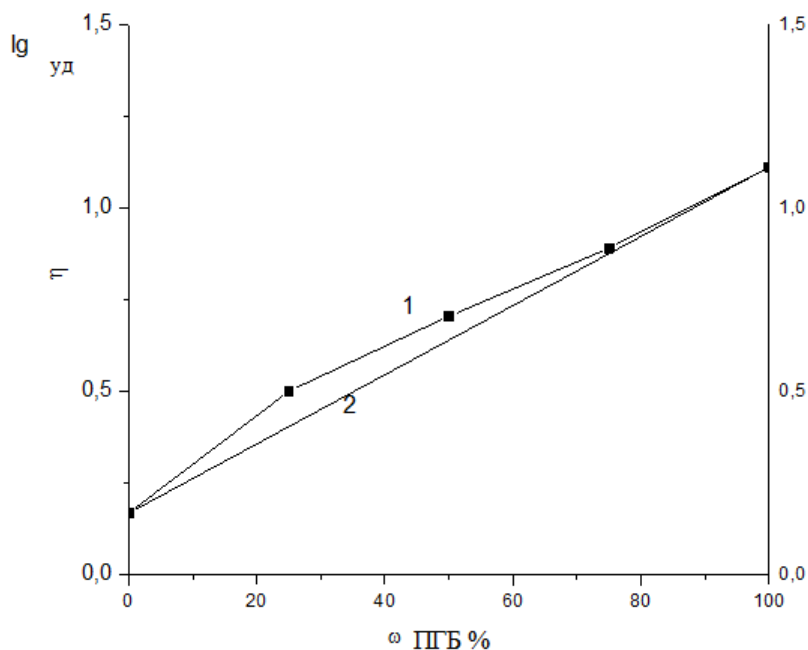


Рисунок 12 - Полулогарифмическая зависимость удельной вязкости смешанного раствора ПКЛ-ПГБ в хлороформе от состава. 1 – экспериментальная, 2 – теоретическая зависимости [165].

### 2.1.3 Реологические свойства растворов ПГБ и смешанных растворов

#### ПГБ и ПКЛ

Чтобы оценить способность ПГБ и смесей на его основе к переработке в пленки и волокна были изучены реологические свойства 3%-ных смешанных растворов ПГБ и ПКЛ, а также температурная зависимость динамической вязкости систем разного состава (рисунки 13, 14 и 15, таблица 6).

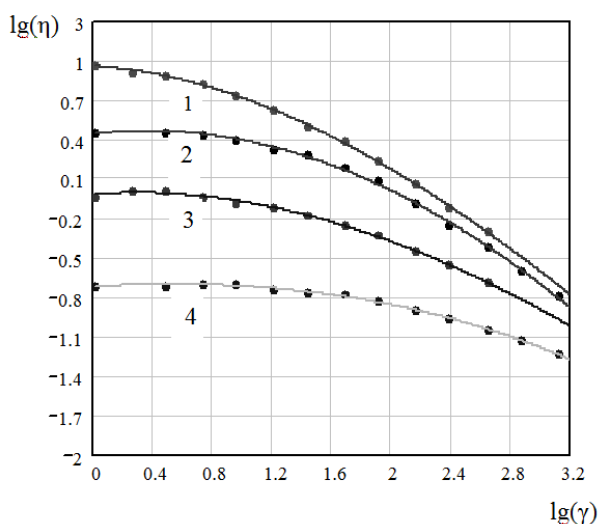


Рисунок 13 - Реологические кривые 3% растворов ПГБ (980 кДа) и ПКЛ разного состава в хлороформе 1 – ПГБ; 2 – ПГБ-ПКЛ 75:25; 3 - ПГБ-ПКЛ 50:50; 4 - ПГБ-ПКЛ 25:75.

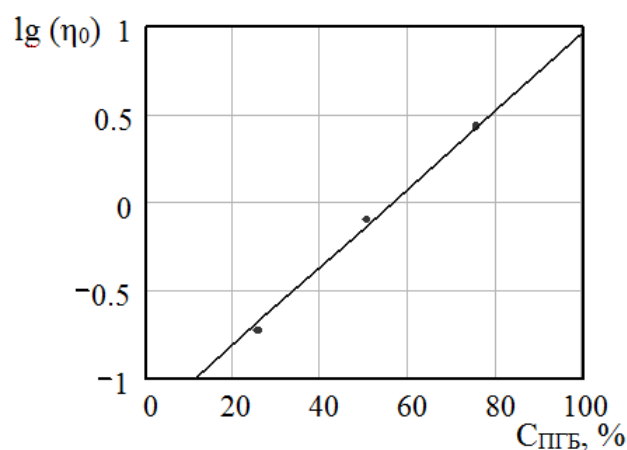


Рисунок 14 - Зависимость начальной вязкости от состава 3%-ных смешанных растворов ПГБ (980 кДа) и ПКЛ.



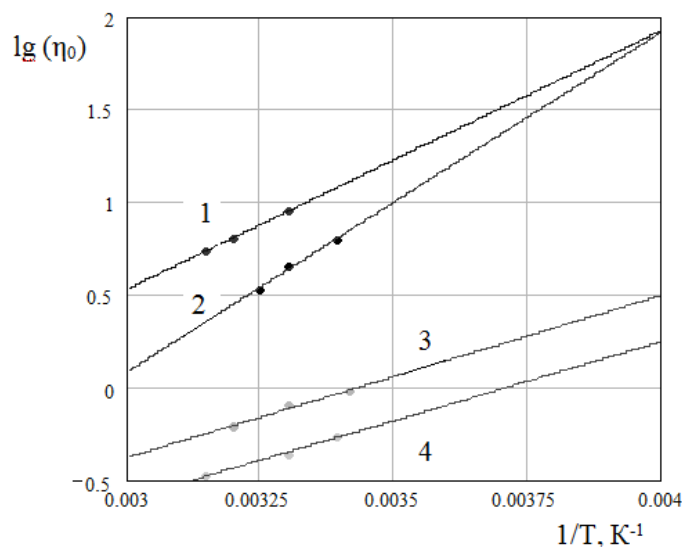


Рисунок 15 - Зависимость начальной вязкости 3%-ных растворов ПГБ (980 кДа) и ПКЛ от температуры. 1 – ПГБ в хлороформе; 2 – ПГБ в метиленхлориде; 3 – ПГБ-ПКЛ 50:50 в хлороформе; 4 – ПГБ-ПКЛ 50:50 в метиленхлориде.

Как видно из полученных результатов, 3%-ный раствор ПГБ (980 кДа) в хлороформе представляет собой структурированную жидкость: реологическая кривая 1 (рисунок 13) не имеет участка ньютоновской вязкости в исследуемых пределах градиента скоростей. Начальная вязкость раствора ПГБ составляет 9,15 Па·с. Введение в состав полимерной смеси ПКЛ с ММ 50 кДа, вязкость 3%-ного раствора которого не удалось измерить на реовискозиметре из-за ее низких значений, снижает вязкость смешанного раствора, причем  $\lg \eta_0$  изменяется пропорционально составу смеси (рисунок 14), что указывает на аддитивность свойств и подтверждает полученные ранее расчетные данные о совместимости ПГБ и ПКЛ. Вязкость раствора смеси ПГБ и ПКЛ в хлороформе имеет менее выраженную зависимость от температуры, чем раствор ПГБ (рисунок 15): энергия активации вязкого течения 3%-ного смешанного раствора ПГБ-ПКЛ (50:50) в хлороформе  $E_a = 16,7$  кДж/моль, а раствора ПГБ  $E_a = 26,7$  кДж/моль.

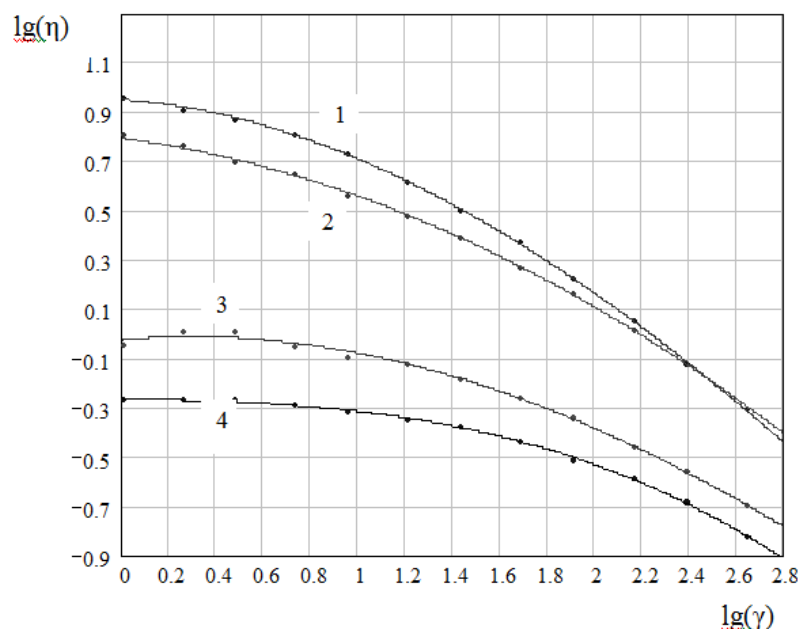


Рисунок 16 - Реологические кривые 3%-ных растворов полимеров ПГБ (980 кДа) и ПКЛ. 1 – ПГБ (980 кДа) в хлороформе; 2 – ПГБ (980 кДа) в метиленхлориде; 3 - ПГБ (980 кДа) и ПКЛ 50:50 в хлороформе; 4 - ПГБ (980 кДа) и ПКЛ 50:50 в метиленхлориде.

Таблица 6 - Реологические свойства 3%-ных растворов ПГБ (980 кДа) и его смеси с ПКЛ в хлороформе.

№ п/п	Соотношение полимеров, %		растворитель	Начальная вязкость $\eta_0$ , Па·с	Степень структурирования, $n^*$	Энергия активации вязкого течения $E_a$ , кДж/моль
	ПГБ	ПКЛ				
1	100	-	хлороформ	9,02	0,47	26,7
2	75	25	хлороформ	2,74	0,29	-
3	50	50	хлороформ	0,95	0,24	16,7
4	25	75	хлороформ	0,19	0,09	-
5	100	-	метиленхлорид	6,25	0,30	41,0
6	50	50	метиленхлорид	0,54	0,08	16,2

\*степень структурирования при градиенте скорости равном  $16 \text{ c}^{-1}$

Качество растворителя сказывается не только на свойствах разбавленных растворов ПГБ, но влияет и на характер кривых течения растворов ПГБ (рисунки 13-15) и его смесей с ПКЛ (рисунок 16). Сольватация макромолекул ПГБ в метиленхлориде выше, чем в хлороформе, что ослабляет межцепные взаимодействия в растворе. Это, в свою очередь, приводит к снижению степени структурирования (таблица 6) и появлению на кривой течения участка наибольшей ньютоновской вязкости. Вязкость раствора ПГБ-ПКЛ 50:50 в метиленхлориде значительно ниже вязкости смеси соответствующего состава в хлороформе, и раствор еще меньше структурирован. Следует отметить, что энергия активации вязкого течения 3%-ного раствора ПГБ в хлороформе имеет

очень высокое значение, что является характерным для растворов с вязкостью, приближающейся к 10 Па·с. По-видимому, процессы структурирования в растворе приводят к образованию крупных ассоциатов, взаимодействия между которыми слабее взаимодействий между макромолекулами, и сдвиговые воздействия легко разрушают структуру раствора.

#### 2.1.4 Фазовые равновесия в растворе ПГБ и ПКЛ в хлороформе

Согласно теории Флори-Хаггинса для растворов полимеров, если два полимера имеют общий растворитель, то с его присутствии всегда может быть получена однофазная система, содержащая оба эти полимера, независимо от степени их совместимости. Испарение растворителя, приводящее к концентрированию раствора, приводит к разделению фаз и формированию гетерогенной системы [195].

Переход от однофазной системы к гетерофазной характеризуется изменением мутности системы, которая может быть зарегистрирована по изменению оптической плотности. Как правило, зависимость оптической плотности от концентрации исследуют при длине волны  $\lambda=400$  нм. Следует отметить, что и ПКЛ, и ПГБ – кристаллизующиеся полимеры, поэтому в первую очередь соответствующие зависимости были получены для растворов индивидуальных полимеров в хлороформе (рисунки 17 и 18).

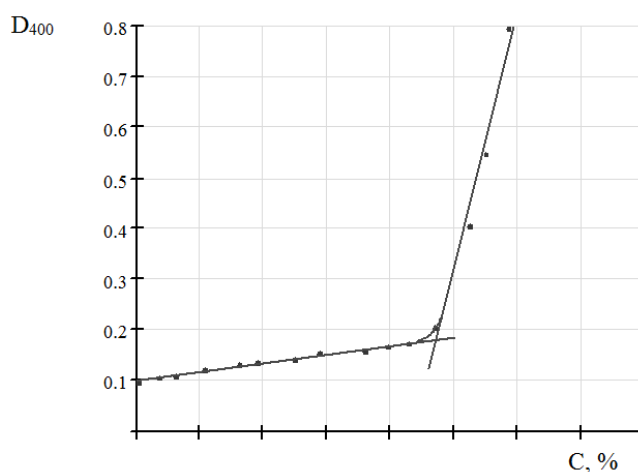


Рисунок 17 - Изменение оптической плотности раствора ПГБ (980 кДа) в процессе испарения хлороформа.

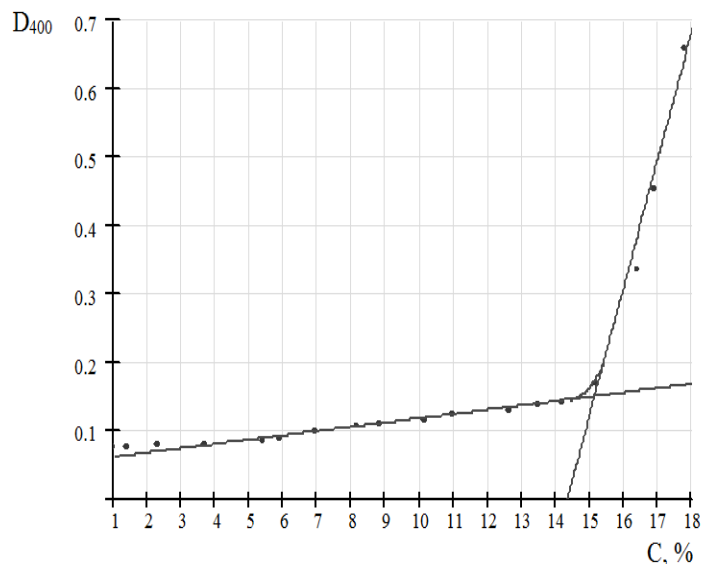


Рисунок 18- Изменение оптической плотности растворов и ПКЛ в процессе испарения хлороформа.

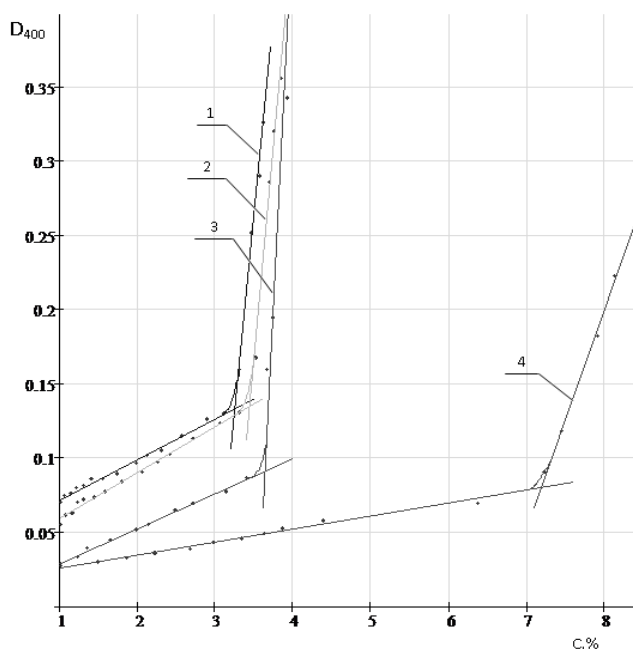


Рисунок 19 - Изменение оптической плотности смешанных растворов ПГБ (980 кДа) и ПКЛ в процессе испарения хлороформа. 1 – ПГБ-ПКЛ 75:25; 2 – ПГБ-ПКЛ 50:50; 3 – ПГБ – ПКЛ 25:75; 4 – ПГБ-ПКЛ 10:90.

Фазовая диаграмма трехкомпонентной системы ПГБ (980 кДа) – ПКЛ - хлороформ (рисунок 20) была получена путем определения точек помутнения в процессе испарения растворителя из смешанных растворов с суммарной концентрацией полимеров 1% (рисунок 19). Форма бинодали говорит о том, что в большом диапазоне составов фазовое разделение в системе ПГБ-ПКЛ-хлороформ происходит за счет кристаллизации ПГБ, который выделяется из раствора при низкой концентрации – 3,3% даже в отсутствие ПКЛ (рисунок 20) [198].

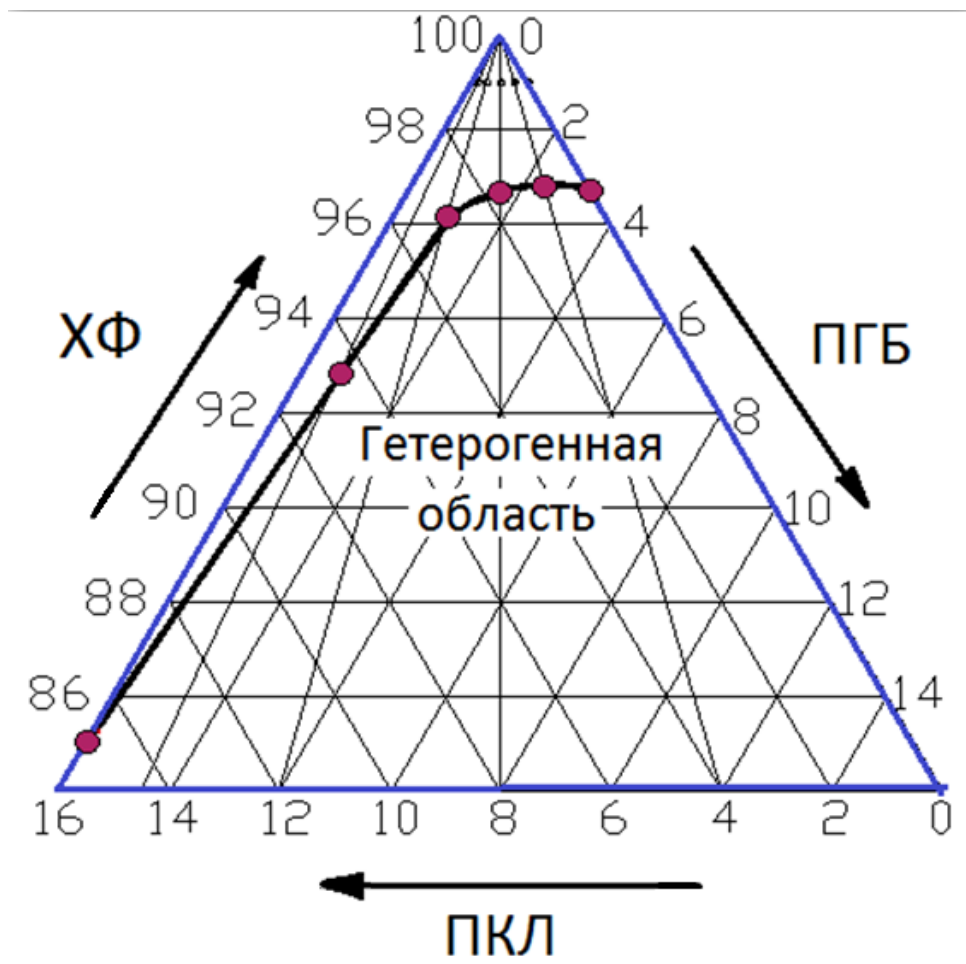


Рисунок 20 - Фазовая диаграмма трехкомпонентной системы ПГБ (980кДа)-ПКЛ-хлороформ [198].

Введение в раствор ПГБ ПКЛ вплоть до соотношения полимеров 1:2 практически не влияет на значение точек помутнения, и фазовое разделение происходит при одной и той же концентрации смешанного раствора. Напротив, добавление раствора ПГБ в раствор ПКЛ даже в небольших количествах (10%), оказывает существенное влияние на концентрацию, при которой происходит фазовое разделение, снижая ее с 15% для ПКЛ до 7% для смешанного раствора ПКЛ и ПГБ (980 кДа) (9:1) в хлороформе (рисунок 20). Таким образом, расположение фигуративных точек, соответствующих сосуществующим фазам на фазовой диаграмме, позволяет предположить разный характер фазового равновесия в рассматриваемой тройной системе. Весьма вероятно, что при соотношении ПГБ-ПКЛ 100:0 – 50:50 реализуется кристаллическое равновесие – ПГБ кристаллизуется в равновесии с раствором, а в области 50:50 – 0:100 может происходить либо аморфное расслоение –распадается на две жидкие равновесные фазы с различным содержанием полимеров, либо сочетание аморфного и

кристаллического равновесия.

Таким образом, на основании изучения фазовых равновесий в трехкомпонентной системе ПГБ – ПКЛ – хлороформ определена необходимая для переработки из растворов область составов, в которой исследуемая система гомогенна: ПГБ и ПКЛ в области концентраций 2-4% образуют прозрачные растворы во всем диапазоне составов. Для получения пленок смешанного состава будут использованы растворы с концентрацией в этом диапазоне и с соотношением ПГБ – ПКЛ 75:25; 50:50 и 25:75.

## **2.2 Получение и исследование пленок из смеси полигидроксibuтирата и поликапролактона**

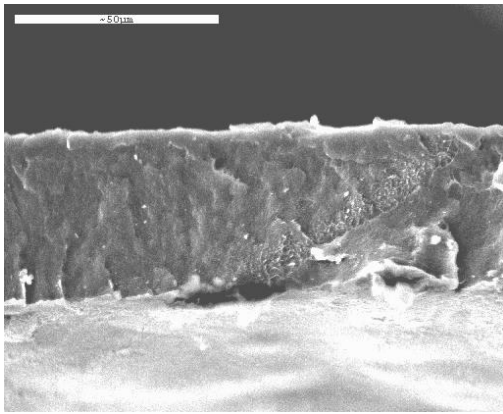
Учитывая, что структурные особенности полимерных материалов во многом определяют возможность их использования в той или иной области медицины или фармакологии, установление взаимосвязи между составом композиции, морфологией и свойствами пленки на основе ПГБ является основой выбора параметров стадии технологического процесса приготовления формовочной композиции. Целью настоящего раздела работы явилось исследование закономерностей структурообразования в смешанных растворах ПГБ и ПКЛ в процессе испарения растворителя при получении пленок методом полива, а также морфологии и свойств полученных пленок.

### **2.2.1 Изучение морфологии пленок из ПГБ и ПКЛ**

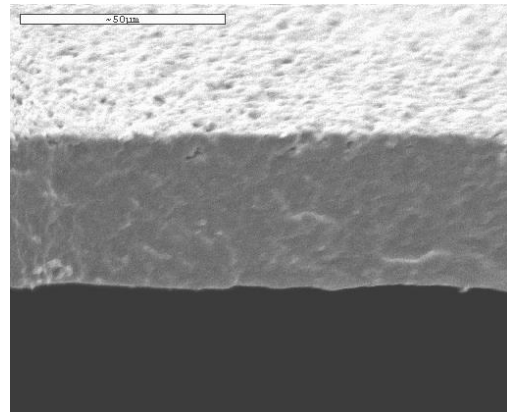
Морфология полимерных пленок, полученных из смешанных растворов в общем растворителе, определяется многими факторами: характером фазового разделения, составом смеси, соотношением скоростей фазового разделения и испарения растворителя, природой растворителя и вязкостью системы в момент достижения фазового равновесия. Влияние некоторых из этих факторов на морфологию и свойства пленок, полученных из 3%-ных растворов ПГБ и ПКЛ в общем растворителе было изучено в настоящем разделе работы.

Исследования проводились методом электронной микроскопии сколов пленок, полученных формованием в чашках Петри. В ряде случаев для замедления процесса испарения растворителя до 24 часов чашки Петри накрывали

кристаллизатором. Следует отметить, что морфология сколов пленок из индивидуальных полимеров типична для кристаллизующихся полимеров, полученных испарением растворителя. На микрофотографии пленки из ПКЛ (рисунок 21а) видны крупные надмолекулярные образования правильной сферической формы с параллельной подложке ориентацией. В пленке из ПГБ (рисунок 21б) присутствуют более мелкие гетерогенные образования. Морфология сколов пленок на основе растворов смеси полимеров разного состава существенно отличается друг от друга (рисунки 22 – 24). Наибольший интерес представляет пленка состава ПГБ-ПКЛ 50:50: она имеет высокопористую структуру с порами размером 5 – 8 мкм (рисунок 22) [198]. Такой характер морфологии не является характерным для пленок из полимерных смесей, в которых одна из фаз, как правило, является непрерывной, а вторая формирует дисперсную фазу [195]. Можно предположить, что наблюдаемая структура пленки обусловлена сильными различиями концентраций, при которых происходит кристаллизация из раствора ПГБ и ПКЛ (рисунок 20). В процессе испарения растворителя кристаллизация ПГБ завершается при концентрациях раствора, не превышающих 4%, ПКЛ остается в системе в виде разбавленного (не выше 2%) раствора, инклюдированного в фазе закристаллизованного ПГБ. В ходе дальнейшего испарения растворителя ПКЛ выделяется на стенках образующихся пор. Контракции пор не происходит ввиду жесткости ПГБ, модуль Юнга которого составляет 1200 МПа [198]. При уменьшении концентрации ПКЛ в смеси пористость не так заметна и сосредоточена больше в приповерхностных областях пленки, где кристаллизация полимера завершается раньше (рисунок 23). В пленке с преимущественным содержанием ПКЛ (рисунок 25) он образует непрерывную фазу – это сказывается на структуре поверхности пленки, аналогичной пленке из ПКЛ (рисунок 21 а). Низкая концентрация ПГБ в системе препятствует объединению фазы ПГБ, а маленькие размеры зародышей кристаллизации, по-видимому, не позволяют различить их на микрофотографиях.



а)



б)

Рисунок 21 - Микрофотографии сколов пленок ПКЛ (а) и ПГБ (б), полученных из растворов в хлороформе.

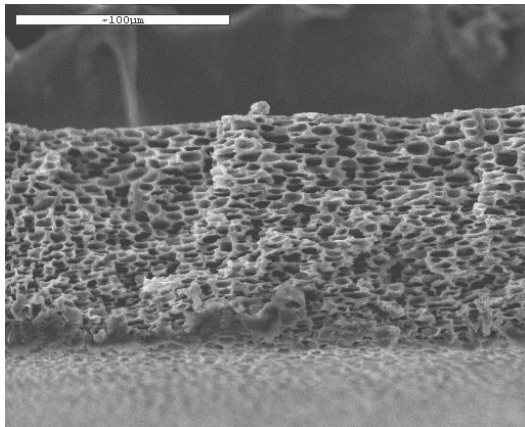


Рисунок 22 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (980 кДа) и ПКЛ (50:50), полученной из раствора полимеров в хлороформе

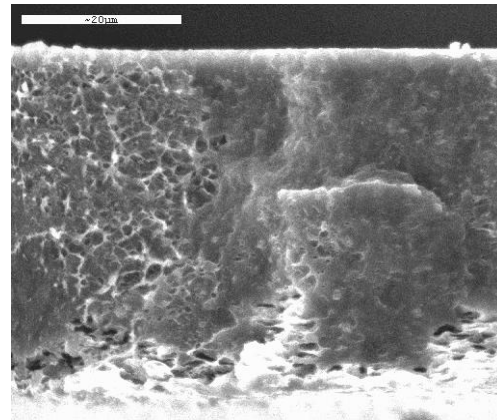


Рисунок 23 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (980 кДа) и ПКЛ (75:25), полученной из раствора полимеров в хлороформе

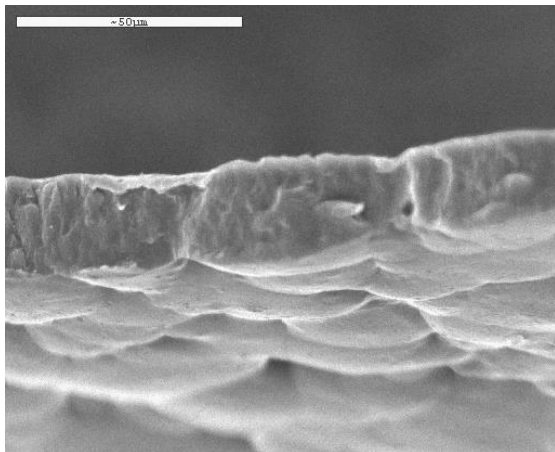
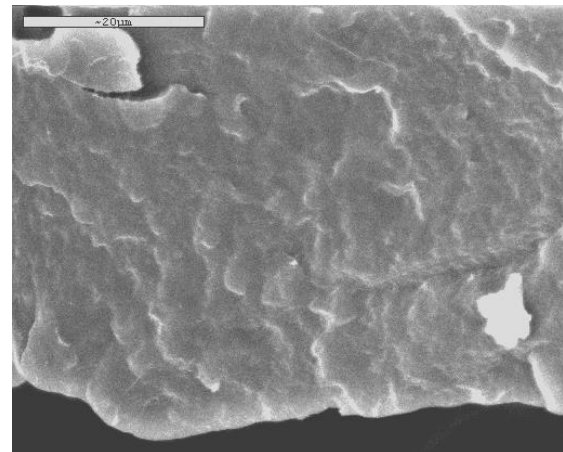


Рисунок 24 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (980 кДа) и ПКЛ (25:75), полученной из раствора полимеров в хлороформе.





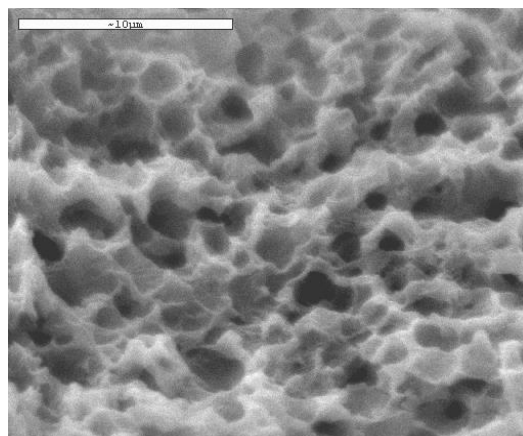
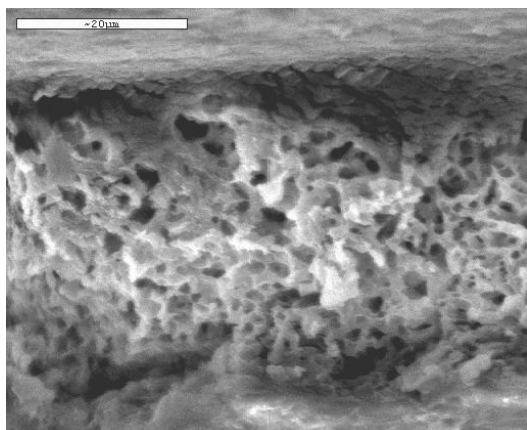


Рисунок 25 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (300 кДа) и ПКЛ (75:25), полученной из раствора полимеров в хлороформе.

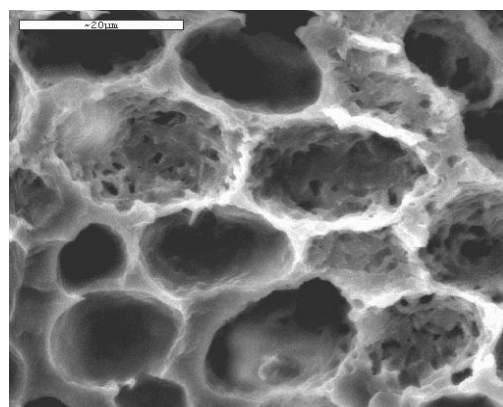
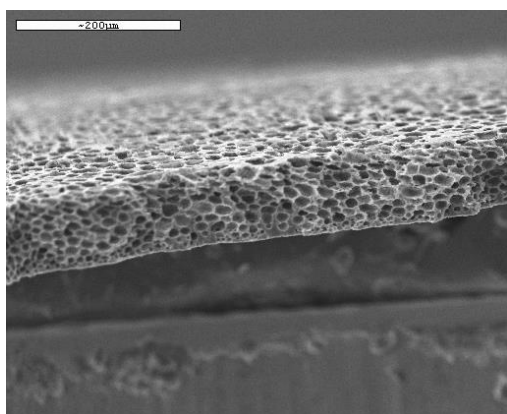


Рисунок 26 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (300 кДа) и ПКЛ (50:50), полученной из раствора полимеров в хлороформе.

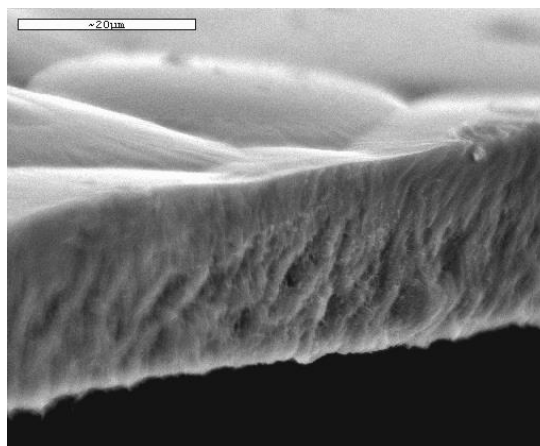
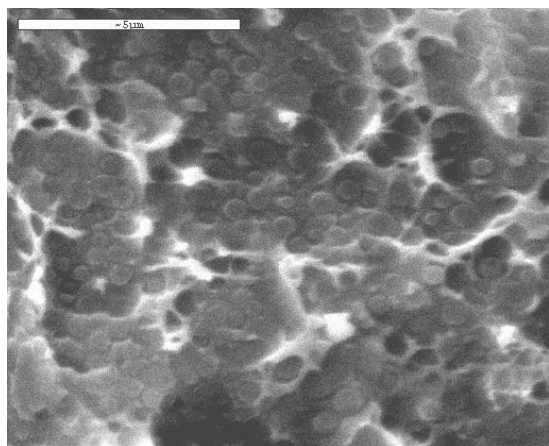


Рисунок 27 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (300 кДа) и ПКЛ (25:75), полученной из раствора полимеров в хлороформе.

Уменьшение молекулярной массы ПГБ приводит к получению пленок ПГБ-ПКЛ состава 50:50 и 75:25 с более крупными порами (рисунки 25 и 26), что может быть обусловлено меньшей вязкостью раствора, из которого кристаллизуется ПГБ (300 кДа). Меньшая вязкость раствора позволяет вырасти зародышам

кристаллизации в растворе смеси ПГБ (300 кДа) – ПКЛ 25:75 до размеров, различимых на электронномикроскопических снимках (рисунок 27).

### 2.2.2 Теплофизические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ

Теплофизические свойства пленок были изучены методом ДСК. В исследованной области температур 40-200°C на термограммах пленок из ПГБ разной молекулярной массы присутствует по одному эндопика, соответствующему плавлению полимера (рисунок 28), однако эндопик ПГБ (980 кДа) раздваивается, что обычно относят к существованию фракции с более мелкими кристаллами. Температура плавления кристаллических фракций ПГБ (980 кДа) составляет 168,0°C и 179,3° С. Фракция с температурой плавления 168,0°C на термограммах ПГБ (300 кДа) менее выражена, а эндоминимум, соответствующий высокотемпературной фракции сдвинут на несколько градусов ниже.

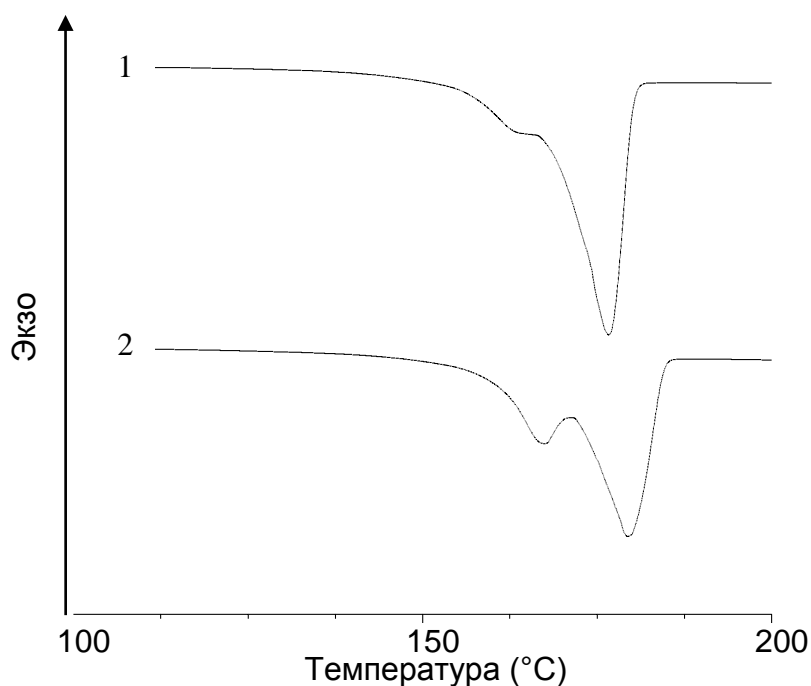


Рисунок 28 - Термограмма (ДСК) пленок из ПГБ разной молекулярной массы. Время испарения растворителя хлороформа 15 мин. 1 – ПГБ (300 кДа); 2 – ПГБ (980 кДа).

В процессе нагрева пленок, полученных из смешанных растворов ПГБ (980 кДа) и ПКЛ в хлороформе, определяются две температуры, соответствующие плавлению кристаллов ПГБ и ПКЛ (рисунок 29, таблица 7).

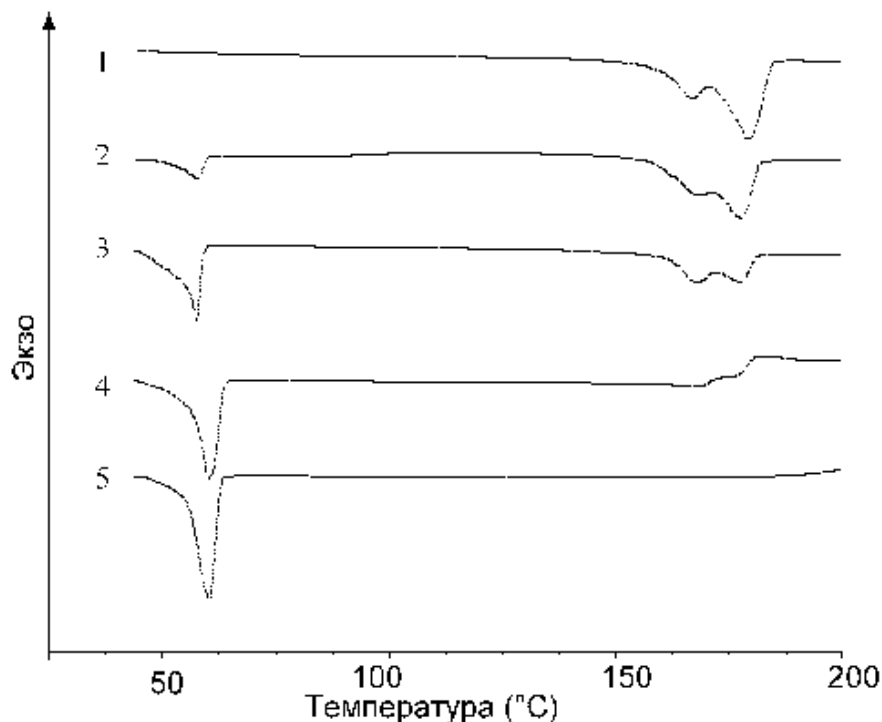


Рисунок 29 - Термограмма (ДСК) пленок на основе ПГБ (980 кДа) и ПКЛ разного состава.  
1 – ПГБ; 2 – ПГБ-ПКЛ 75:25; 3 – ПГБ-ПКЛ 50:50; 4 – ПГБ-ПКЛ 25:75; 5 – ПКЛ.

Таблица 7 Теплофизические параметры пленок разного состава на основе ПГБ (980 кДа) и ПКЛ.

№ п/п	Состав пленки, %		Теплофизические свойства					
			ПГБ			ПКЛ		
	ПГБ	ПКЛ	Т <sub>пл</sub> , °С	ΔН <sub>пл</sub>		Т <sub>пл</sub> , °С	ΔН <sub>пл</sub>	
				Дж/г пленки	Дж/г ПГБ		Дж/г пленки	Дж/г ПКЛ
1	100	-	168,0/179,3	72,4	72,4	-	-	-
2	75	25	168,0/178,1	52,1	69,2	52,4	8,7	35,0
3	50	50	168,5/178,0	34,0	68,0	54,5	22,8	45,6
4	25	75	168,7/176,0	20,1	75,1	55,7	36,3	48,4
5	-	100	-	-	-	58,7	49,9	49,9

Влияние ПКЛ на кристаллизацию ПГБ проявляется не столько в изменении его температуры плавления, сколько в инверсии глубины эндоминимумов, соответствующих плавлению двух кристаллических фракций. И хотя теплота плавления ПГБ, рассчитанная на 1 г полимера, в целом не изменяется, но содержание высокотемпературной кристаллической фракции ПГБ с увеличением содержания ПКЛ в смеси уменьшается (рисунок 29).

Как было показано выше, ПГБ влияет на процесс выделения ПКЛ из смешанного раствора. Это влияние проявляется в уменьшении температуры плавления ПКЛ с ростом содержания в пленке ПГБ на 6,3°С (таблица 7), а также в

снижении энтальпии плавления, что указывает на уменьшение степени кристалличности полимера, связанное с интенсификацией процессов кристаллизации в растворе ПКЛ в присутствии ПГБ.

На процесс кристаллизации ПКЛ в присутствии ПГБ может влиять природа полимера или сам факт присутствия новой фазы, выполняющей роль центров кристаллизации для ПКЛ. На рисунке 30 и в таблице 8 приведены термограммы и теплофизические параметры пленок, полученных из 3%-ных растворов ПКЛ и 20%-ной вводной эмульсии на основе 3%-ного раствора ПКЛ.

Таблица 8 Теплофизические параметры пленок разного состава на основе ПГБ (980 кДа) и ПКЛ.

№ п/п	Состав пленки, %		Объемная доля дисперсной фазы, %	Т <sub>пл</sub> , °С	ΔН <sub>пл</sub>
	ПКЛ	ПГБ			
1	100	-	0	58,7	59,9
2	75	25	25	55,7	48,4
3**	100	-	20	55	46,2

\* Молекулярная масса ПГБ 300 кДа

\*\*Термограмму образца снимали после высушивания пленки до постоянной массы.

Как видно из приведенных данных (рисунок 31), наличие межфазовой поверхности (капель воды) влияет как на температуру плавления, так и на энтальпию плавления ПКЛ. По-видимому, именно возникновение дополнительных центров кристаллизации в процессе фазового разделения в смешанных растворах ПКЛ и ПГБ приводит к изменению свойств кристаллической фазы ПКЛ.

Температура кипения хлороформа составляет 61°C, и при комнатной температуре испарение растворителя из тонкого слоя полимера происходит в течение всего 15-30 минут.

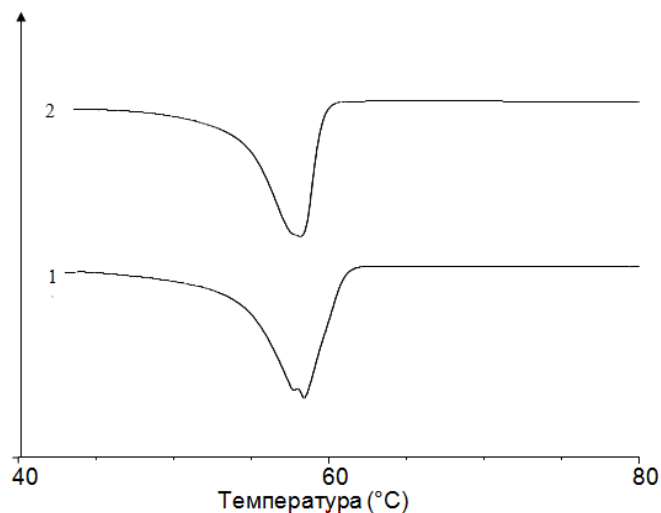


Рисунок 30 - Термограмма пленок из ПКЛ. Время испарения растворителя хлороформа 15 мин. 1 – ПКЛ; 2 – ПКЛ, полученная из 20% эмульсии вода – раствор ПКЛ в хлороформе.

Известно, что процесс фазового разделения развивается во времени, поэтому целесообразно было изучить свойства пленок из ПГБ и ПКЛ, сформованных из хлороформа в течение длительного времени. Для того чтобы замедлить процесс фазового разделения, растворитель испаряли из пленки в замкнутый объем кристаллизатора, которым была накрыта чашка Петри с формовочным раствором. Как видно из результатов ДСК, время испарения растворителя практически не влияет на температуру плавления ПГБ (рисунок 32). Однако в течение более длительной кристаллизации формируется более совершенная структура кристаллов ПГБ: энтальпия плавления образца пленки, полученной с замедлением испарения растворителя, меньше энтальпии плавления пленки, сформованной при быстром испарении растворителя, а следовательно, и содержание мелкокристаллической фракции уменьшается.

Влияние природы растворителя на теплофизические свойства пленок из ПГБ было также изучено методом ДСК. Как видно из термограмм, представленных на рисунке 33, температура плавления ПГБ в пленках, сформованных из метилхлорида, не отличается от температуры плавления пленок, сформованных из хлороформа. Однако в процессе кристаллизации из метилхлорида, имеющего большее сродство к ПГБ, формируется более совершенная кристаллическая структура: практически исчезает мелкокристаллическая фракция, а степень кристалличности увеличивается, о чем свидетельствует увеличение теплоты плавления  $\Delta H_{пл} = 74,6$  Дж/моль.

Морфология скола пленки из смеси ПГБ и ПКЛ 50:50, сформованной из раствора в метиленхлориде, кардинально отличается от морфологии скола пленки из раствора в хлороформе (рисунки 33 и 22). По-видимому, растущие кристаллы ПГБ в этом случае не успевают объединиться в непрерывную фазу до того, как ПКЛ высаживается на их поверхности из разбавленного раствора жидкой фазы. В результате внутренняя структура пленки представляет собой совокупность склеенных между собой частиц разного размера (рисунок 34).

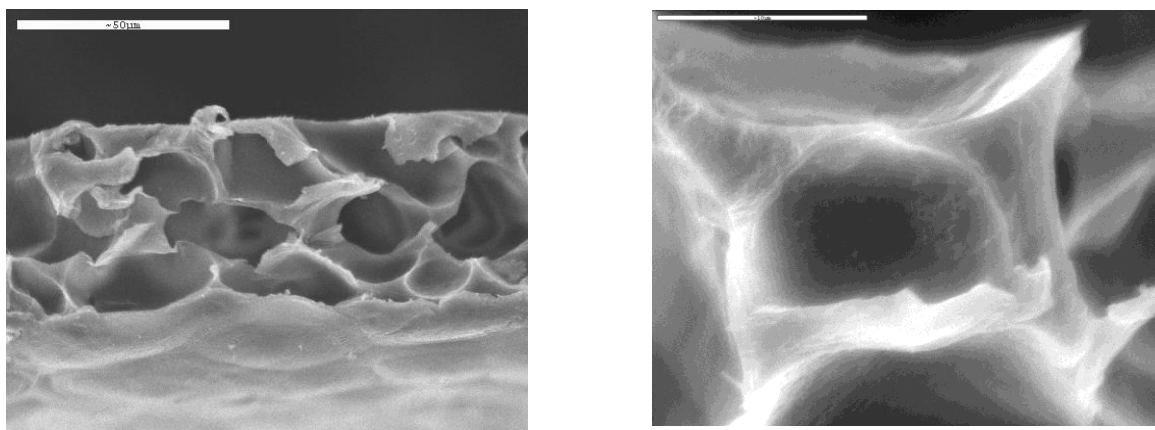


Рисунок 31 - Микрофотографии скола пленки ПКЛ, полученной из 20% эмульсии вода-раствор ПКЛ в метиленхлориде

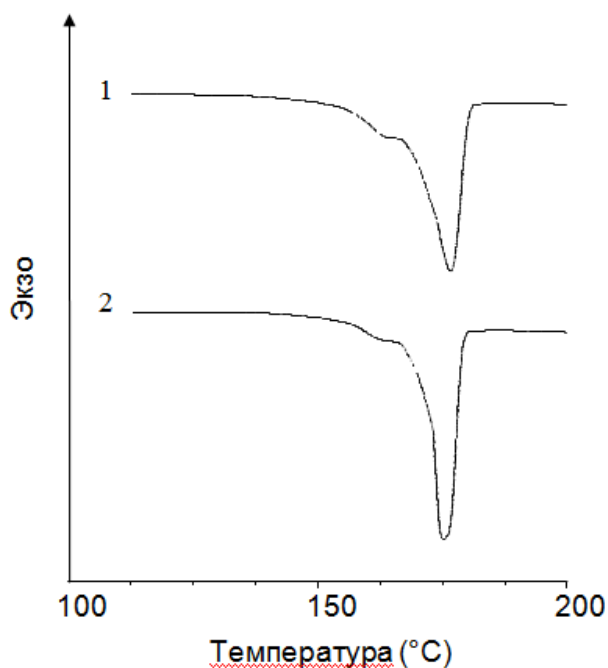


Рисунок 32 - Термограмма пленок из ПГБ (300кДа). 1 – время испарения хлороформа 30 мин; 2 – время испарения хлороформа 24 часа.

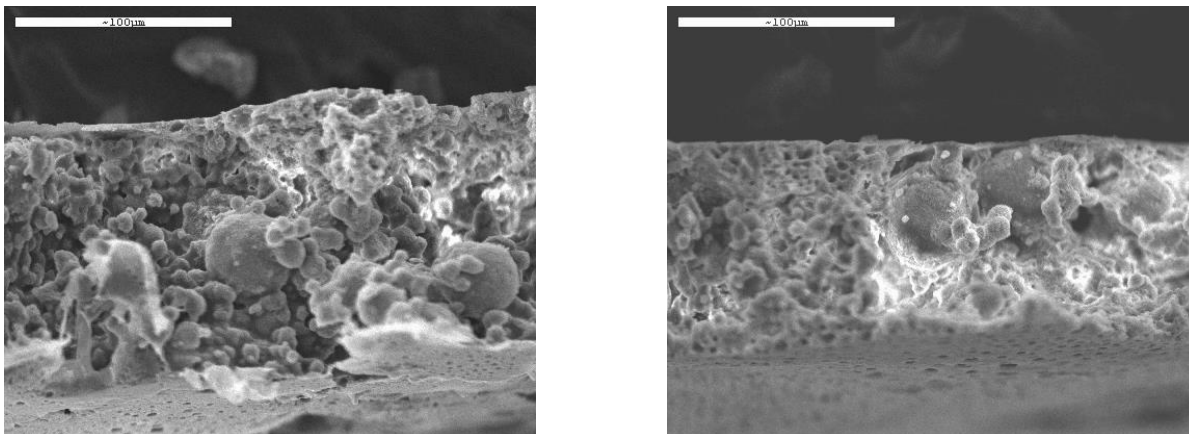


Рисунок 33 - Микрофотографии скола пленки из смеси ПГБ (980 кДа) и ПКЛ (50:50), полученной из раствора полимеров в метиленхлориде.

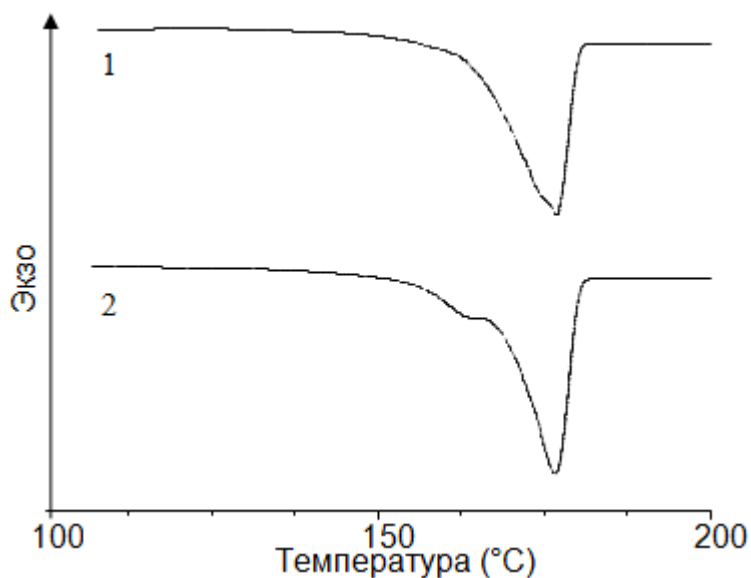


Рисунок 34 - Термограмма пленок из ПГБ (300кДа). 1 – из раствора в метиленхлориде; 2 – из раствора в хлороформе.

### 2.2.3 Термомеханические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ

Описанные в предыдущем разделе термограммы были получены методом ДСК в области температур выше  $20^{\circ}$ , поэтому на них не могли быть зафиксированы температурные переходы, соответствующие стеклованию или другим структурным изменениям при меньшей температуре. Исследования в области более широкого интервала температур были проведены с использованием динамического механического анализа (ДМА), позволяющего определить динамические модули упругости полимерных образцов как функцию температуры при определенной частоте нагружения образца. Метод основан на измерении амплитуд нагрузки (при растяжении) и фазового сдвига между ними

(δ). Метод позволяет определить изменения динамического модуля упругости при растяжении  $E^T$ , пропорционального внесенной и высвобождаемой упругой энергии, модуль Юнга  $E$  и так называемый тангенс угла механических потерь

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'}$$

где  $E''$  – модуль потерь при растяжении, пропорциональный необратимо потерянной преобразованной в тепловую энергию.

На рисунке 35 представлен график зависимости динамического модуля упругости пленки из ПГБ, подвергаемой периодическому нагружению в режиме растяжения с частотой 1 Гц, от температуры в диапазоне от  $-60$  до  $190^\circ\text{C}$ . На кривой можно выделить три ступени снижения модуля. Первая (при температуре около  $-10^\circ\text{C}$ ), соответствует расстекловыванию аморфных областей. Вследствие относительно высокой степени кристалличности ПГБ этот структурный переход характеризуется небольшим изменением модуля с 4,6 до 2,6 ГПа. Между  $60^\circ$  и  $100^\circ\text{C}$  определяется ступень, соответствующая изменениям в кристаллических областях полимера, предшествующим плавлению, а основной процесс плавления начинается при  $190^\circ\text{C}$ .

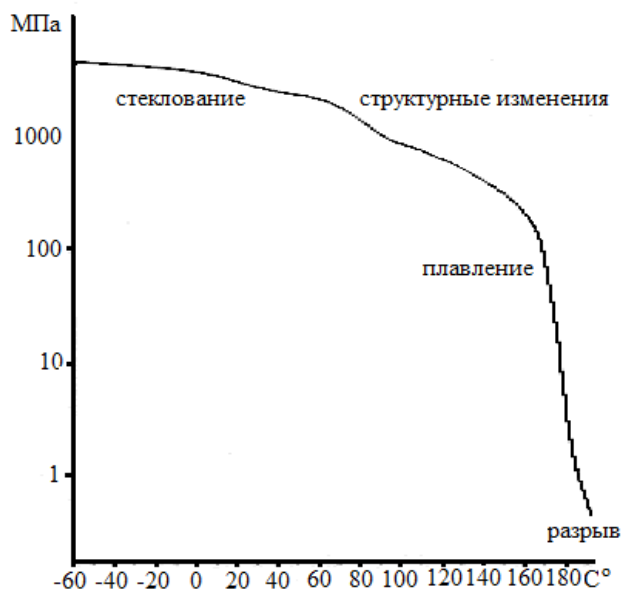


Рисунок 35 - График зависимости динамического модуля упругости пленки из ПГБ от температуры.



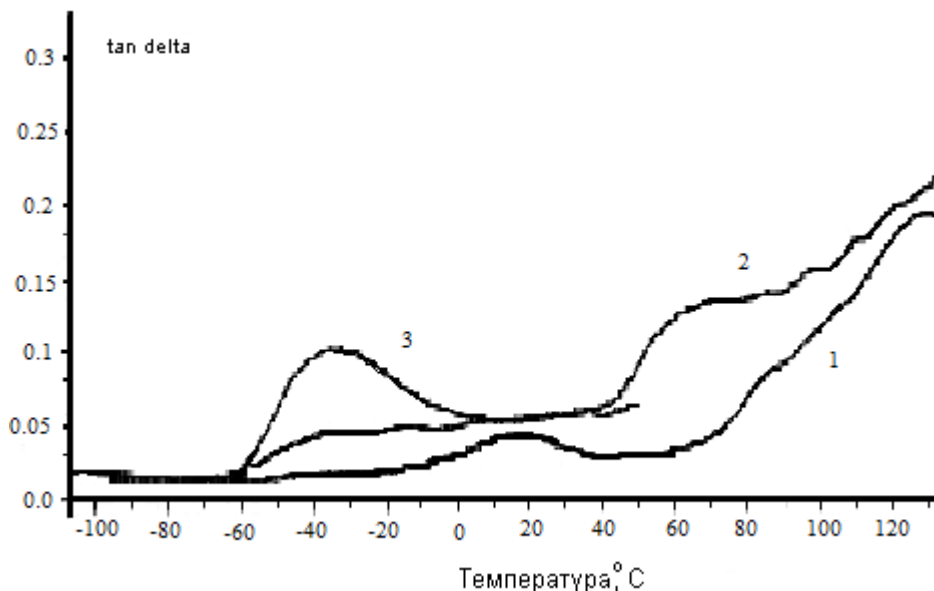


Рисунок 36 - Кривые температурных зависимостей фактора механических потерь  $\tan\delta$ . 1- ПГБ, 2 – ПКЛ, 3- смесь ПГБ-ПКЛ состава 50:50.

Обнаруженный методом ДМА интервал плавления ПГБ лежит в области более высоких температур, чем  $T_{пл}$  полигидроксibuтирата, полученная из данных ДСК ( $T_{пл}=168^{\circ}$ ).

В целом в процессе измерения наблюдались экстремально большие пределы изменения динамического модуля упругости при растяжении: на четыре порядка.

В связи с тем, что для оценки совместимости полимеров большое значение имеют температуры стеклования, последующие сравнительные исследования образцов пленок из ПГБ, ПКЛ и смеси состава 50:50 проводили в интервале температур  $-60...+140^{\circ}\text{C}$ . На рисунке 36 приведены кривые температурных зависимостей фактора механических потерь  $\tan\delta$  для исследуемых образцов пленок.

На кривой  $\tan\delta = f(t^{\circ})$  для образца пленки из смеси ПГБ и ПКЛ наблюдается только один максимум механических потерь в области температур от  $-40$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Этот максимум имеет плечо в сторону увеличения температуры. Характерная для ПГБ температура стеклования в области  $>0$  не наблюдается. Таким образом в пленке смесового состава ПГБ и ПКЛ регистрируется только одна  $T_c$ , представляющая собой суперпозицию температур стеклования чистых компонентов. Этот факт достоверно свидетельствует о совместимости аморфных

областей кристаллизующихся полимеров ПГБ и ПКЛ, что подтверждает данные расчета параметра совместимости полимеров. Увеличение  $\tan\delta$  при  $t > 45^\circ\text{C}$  связано с плавлением ПКЛ в образце пленки.

Интересно отметить, что механические свойства пленки, полученной из раствора смеси полимеров в области температуры  $t > T_{\text{сПКЛ}}$  определяются не правилом аддитивности, а свойствами ПКЛ: значения модуля Юнга пленок из ПКЛ и ПГБ (50:50) составляют 200 и 220 МПа соответственно (таблица 9).

Таблица 9 - Результаты ДМА пленок различного состава

№	Состав пленки		T <sub>c</sub> , °C	T плавления, °C	Модуль Юнга (25°C), МПа
	ПГБ	ПКЛ			
1	100	0	20	175	1200
2	50	50	-30	-	220
3	0	100	-35	61	200

Этот факт также указывает на то, что преобладающим в составе матричной фазы пленки из смеси является кристаллический ПКЛ.

Описанные в настоящей главе результаты исследований морфологии и свойств пленок на основе ПГБ и ПКЛ позволят при разработке биodeградируемых материалов для медицины или экологии путем изменения соотношения биodeградируемых полиэфигов или использования ПГБ разной ММ направленно изменять пористую структуру, а, следовательно, и эксплуатационные свойства полимерных пленок, получаемых из раствора смеси полимеров путем испарения растворителя [165].

#### 2.2.4 Физико-механические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ

Прочность пленок не является характеристикой, определяющей возможность использования пленок в качестве раневых покрытий, однако характер изменения прочности и разрывного удлинения композиционных материалов при изменении состава пленки содержит информацию об особенностях морфологии материала. Введение второго полимера должно также существенно влиять на физико-механические свойства полимерной пленки. Если полимеры совместимы или образуют взаимопроникающие сетки, можно ожидать аддитивности свойств композиционных материалов на их основе. Если смеси полимеров образуют

гетерогенные структуры, то прочность пленок на их основе будет определяться полимером, образующим непрерывную фазу.

Таблица 10 - Физико-механические свойства пленок из ПГБ и ПКЛ.\*

№ п/п	Состав пленки, %		Толщина, мкм	Разрывная нагрузка F, Н	Прочность P, МПа	Относительное разрывное удлинение $\varepsilon$ , %
	ПГБ	ПКЛ				
1	100	-	52,6	9,9	37,6	0,4
2	75	25	46,8	4,1	17,5	3,6
3	50	50	129	7,3	11,4	7,9
4	25	75	88	2,4	5,4	40,7
5	-	100	107	9,24	17,3	700

\* Пленки получены из 3%-ных растворов в хлороформе.

Как видно из полученных данных (таблица 10), прочность пленок из ПГБ оказалась наиболее высокой, при этом при разрыве образец практически не деформировался  $\varepsilon = 0,4\%$ . Уменьшение прочности композиционных пленок происходит не аддитивно и, в соответствии с высказанными ранее представлениями, определяется характером возникающей морфологической структуры. Некоторый рост относительного удлинения объясняется увеличением содержания ПКЛ в фазе, формирующей дисперсионную среду, в процессе кристаллизации из раствора или выделения ПКЛ на поверхности пор при испарении хлороформа уже после разделения фаз. Пленки состава ПГБ-ПКЛ 25:75 в качестве дисперсионной среды содержат, вероятнее, ПКЛ – об этом свидетельствует высокое, по сравнению с пленками других составов, относительное разрывное удлинение, характерное для ПКЛ (таблица 10). Как видно из данных таблицы 3.4, прочность этой композиционной пленки ниже прочности пленок из чистых полимеров и ниже прочности пленок других составов. Это может быть связано только с наличием частиц изолированной фазы из жесткого ПГБ, включенных в структуру пленки. Эти частицы служат концентраторами напряжений и вызывают резкое снижение прочности.

Таким образом, результаты изучения физико-механических свойств пленок подтверждают предположения о составе непрерывной и дисперсной фаз композиционных пленок при разном соотношении ПГБ - ПКЛ.

### 2.2.5 Изучение надмолекулярной структуры пленок, полученных из смешанных растворов ПГБ и ПКЛ

Пленки из индивидуальных ПГБ и ПКЛ, а так же смеси ПГБ и ПКЛ разного состава, полученные методом полива с последующим испарением растворителя, были изучены методом ИК-спектроскопии. Для интерпретации полученных данных были записаны ИК-МНПВО спектры (инфракрасные спектры многократно нарушенного полного внутреннего отражения) пленок из ПКЛ, закристаллизованных в течение разного времени. На рисунке 37 приведены кинетические данные по кристаллизации ПКЛ, полученные в диапазоне 1600-900  $\text{см}^{-1}$ , содержащем полосы поглощения кристаллической фазы. Максимумы 1188, 1241, 1294 и 1367  $\text{см}^{-1}$  идентифицированы как относящиеся к кристаллической фазе ПКЛ. Полученные данные хорошо согласуются с результатами изучения кинетики кристаллизации ПКЛ методом ИК «на просвет» полученными в работе [199]. Уменьшение скорости испарения растворителя приводит к возрастанию степени кристалличности ПКЛ.

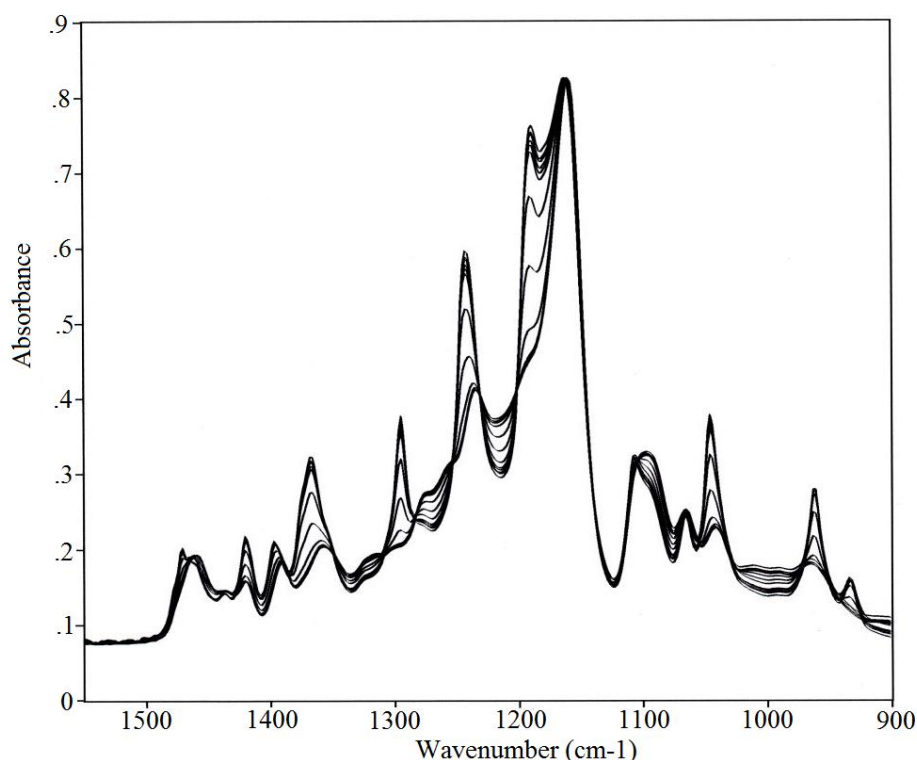


Рисунок 37 - Зависимость интенсивности спектров ИК-МНПВО плёнок из чистого ПКЛ от времени кристаллизации.

Именно этим объясняются различия в спектрах разных сторон плёнки из чистого ПКЛ: обращённой к стеклу (кривая 1, рисунок 38) и воздуху (кривая 2, рисунок 38).

ПГБ напротив, сохраняет свою степень кристалличности постоянной. Этот вывод подтверждается сравнением ИК-МНПВО спектров индивидуальных полимеров с разных поверхностей. На рисунке 39 приведены спектры ИК-МНПВО приповерхностных слоёв плёнок из индивидуальных ПГБ и ПКЛ в диапазоне 1500-980  $\text{cm}^{-1}$ , захватывающем 1188  $\text{cm}^{-1}$  – полосу кристалличности ПКЛ.

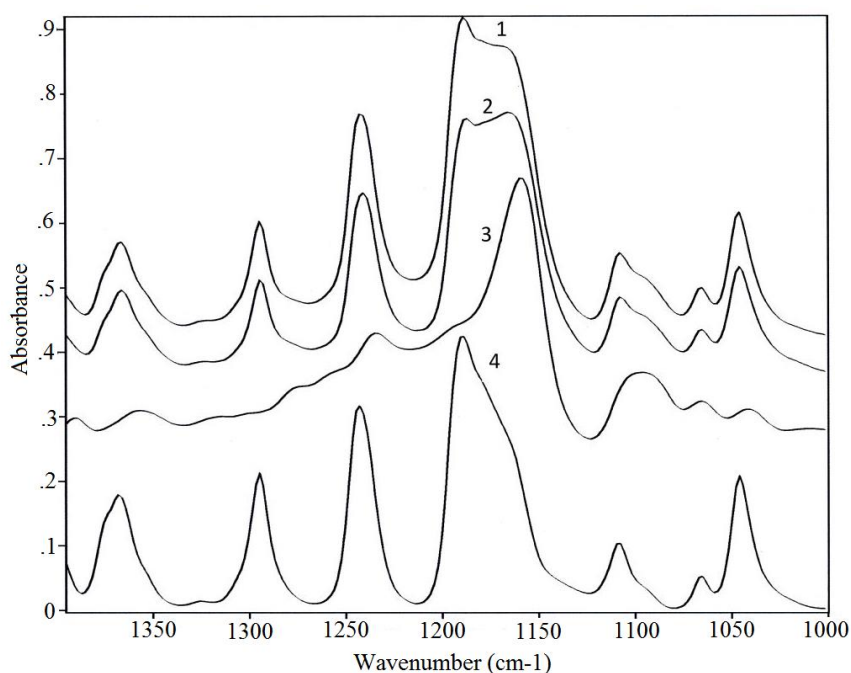


Рисунок 38 - Спектры плёнки из чистого ПКЛ: 1- «к стеклу», 2 – «к воздуху», 3 – спектр полностью аморфного ПКЛ, 4 – синтетический спектр полностью закристаллизованного ПКЛ.

Отношение интенсивностей характеристических полос ПГБ остаётся идентичным (рисунок 39 спектр 1 и 2), что свидетельствует о постоянной степени кристалличности, несмотря на разницу скорости испарения растворителя и соответственно скорости кристаллизации на границе полимер-воздух и полимер-стекло.

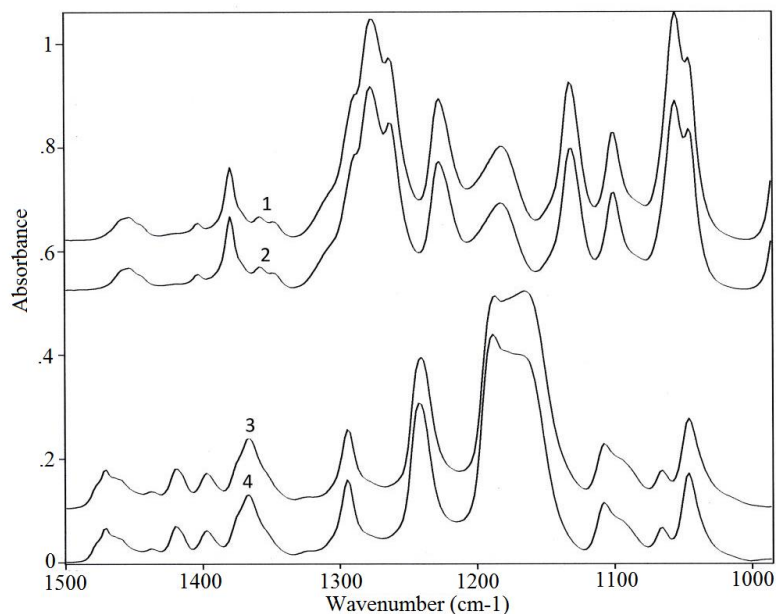


Рисунок 39 - Спектры ИК-МНПВО в диапазоне 1550-1300 см-1. 1 – 100% ПГБ сторона «к воздуху»; 2 - 100% ПГБ сторона «к стеклу»; 100% ПКЛ сторона «к воздуху»; 100% ПКЛ сторона «к стеклу».

Данные ИК МНПВО спектроскопии смешанных плёнок показывают наличие взаимного влияния компонентов смеси на кристалличность. Например, на спектрах плёнки состава ПГБ/ПКЛ 75/25 (рисунок 40) можно видеть ряд отличий между стороной «к стеклу» и стороной «к воздуху». Данные изменения в спектре связаны, вероятно, с изменением степени кристалличности ПКЛ. Это подтверждается, что полосы, в которых наблюдаются несоответствия ( $840$ ,  $731$  и  $453\text{см}^{-1}$ ) относятся к кристаллической фазе ПКЛ, в то время как интенсивность максимумов поглощения ПГБ остаётся практически неизменной. Это указывает влияния ПГБ на кристаллизацию ПКЛ.

Вероятно, здесь имеет место механизм предложенный в работе [200], при котором скорость фронта кристаллизации ПГБ превышает скорость диффузии макромолекул ПГБ из объёма раствора и кристаллиты

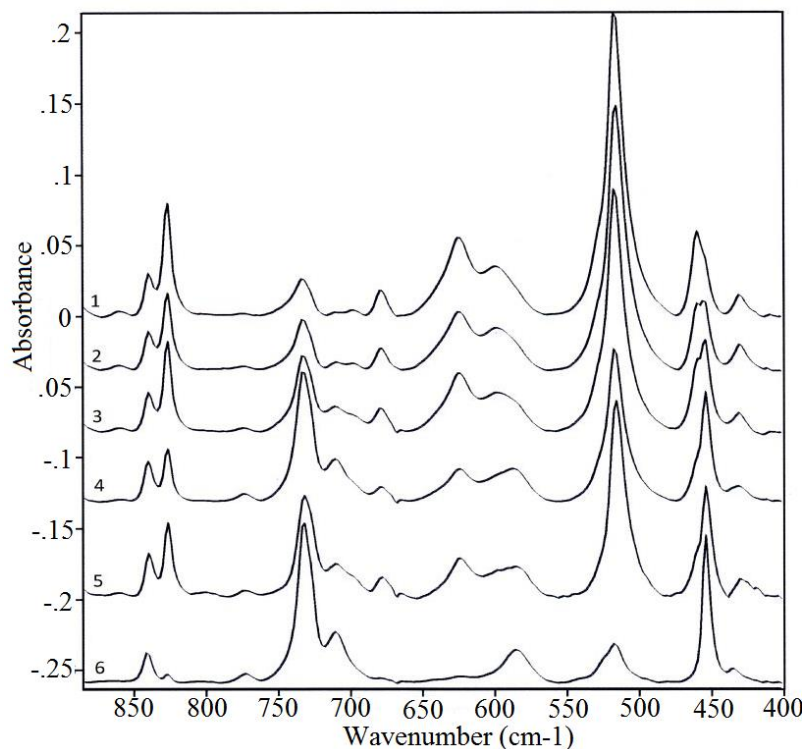


Рисунок 40 - Спектры ИК-МНПВО в диапазоне 900-400 см<sup>-1</sup>: 1) 75ПГБ/25ПКЛ (к воздуху), 2) 75ПГБ/25ПКЛ (к стеклу), 3) 50ПГБ/50ПКЛ (к воздуху), 4) 50ПГБ/50ПКЛ (к стеклу), 5) 25ПГБ/75ПКЛ (к воздуху), 6) 25ПГБ/75ПКЛ (к стеклу).

ПГБ образуют разветвлённые дендритные структуры, в которых макромолекулы ПКЛ располагаются вдоль ламелей ПГБ [201].

### **2.2.6 Особенности формирования градиентного состава пленок, полученных из смешанных растворов полимеров.**

При формировании пленок из низкоконцентрированных растворов методом испарения растворителя из слоя формовочного раствора возникает градиент скоростей кристаллизации полимеров в направлении от поверхности пленки к подложке за счет разного диффузионного пути молекул растворителя из глубины слоя к поверхности. Этот факт может быть причиной изменения состава пленки в областях, прилегающих к подложке, по сравнению с поверхностью, контактирующей с воздухом.

С целью изучения влияния динамики испарения растворителя на изменение состава пленки, полученной из смешанного раствора полимера в общем растворителе, по ее толщине, была изучена кинетика испарения хлороформа из плёнок на основе ПГБ, ПКЛ и их смеси состава 50:50. Как видно из приведенных

данных (рисунок 41), испарение растворителя из растворов ПГБ, ПКЛ и их смеси происходит с близкими скоростями. Несколько большая скорость испарения хлороформа из раствора ПКЛ объясняется более низкой вязкостью эквиконцентрированных раствора ПКЛ по сравнению с ПГБ (рисунок 41). На основании полученных кинетических данных в рамках решения Больцмана второго закона Фика были рассчитаны значения коэффициентов диффузии хлороформа и их изменение в процессе испарения растворителя (рисунок 41).

$$D = [(M \times \pi^{1/2} \times l) / (4 \times M_{\infty} \times t^{1/2})]^2 \quad (16)$$

где,  $D$  – коэффициент диффузии растворителя;  $M$  – масса раствора;  $M_{\infty}$  – масса абсолютно сухой пленки;  $l$  – толщина слоя раствора;  $t$  – время.

Для построения полной кинетической кривой использовался математический аппарат для решения диффузионных задач процессов сушки, предложенный Ефремовым Г.И. [202].

Расчет показал, что коэффициент диффузии хлороформа в начале процесса на 9 порядков выше (рисунок 42), чем в конце, когда растворителя в системе остается мало, и он в значительной степени связан с полимером.

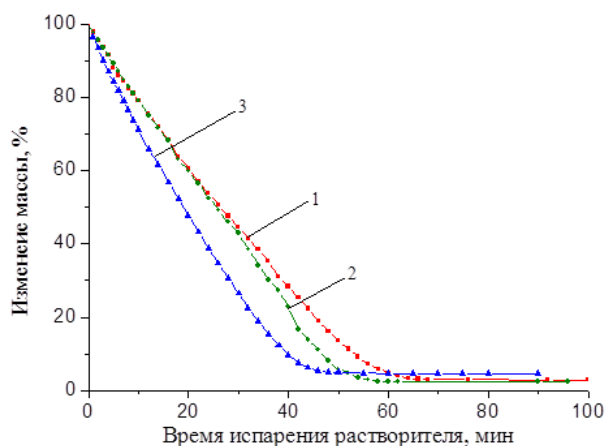


Рисунок 41 - Кинетика испарения растворителя из пленок на основе ПГБ (1), смеси ПГБ-ПКЛ состава 1:1 (2), ПКЛ (3).

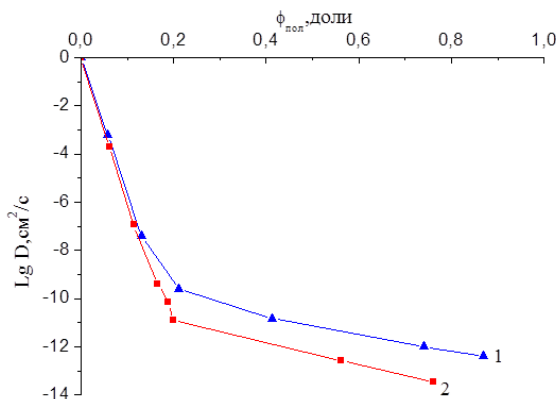


Рисунок 42 - Зависимость коэффициента диффузии растворителя от массовой доли полимера в растворе в процессе испарения растворителя из растворов ПГБ (1) и ПКЛ (2) в хлороформе.

Как было показано выше, вязкость раствора ПГБ значительно превышает вязкость раствора ПКЛ. Согласно закону Стокса – Эйнштейна, коэффициент диффузии в жидкой среде при постоянной температуре обратно пропорционален вязкости раствора:



$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot r \cdot \eta} \quad (17)$$

где,  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $r$  – радиус диффундирующей молекулы,  $\eta$  – динамическая вязкость. Вследствие этого значения коэффициентов диффузии растворителя в концентрированных растворах ПГБ и ПКЛ также отличаются друг от друга в несколько раз (рисунок 42). И это, в свою очередь, даже при одинаковой поверхности испарения и толщине слоя раствора пленкообразующего полимера, приводит к различиям в значениях  $D$  при его испарении из смешанных растворов разного состава.

С целью изучения градиентного состава пленок (100 мкм), полученных из растворов смеси ПГБ и ПКЛ с соотношением полимеров (75:25, 50:50, 25:75), был использован метод ИК-МНПВО. Глубина проникновения излучения обратно пропорциональна значению волнового числа и показателю преломления материала:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(\sin^2 \theta - n^2)^{1/2}} \quad (18)$$

где,  $\theta$  – угол падения излучения;  $n$  – показатель преломления исследуемого материала,  $\lambda$  – длина волны излучения в призме, равная отношению длины волны подающего излучения к показателю преломления кристалла германиевой призмы ( $\lambda_0/n_{Ge}$ );

Таким образом, глубина проникновения изменяется в зависимости от длины волны излучения или угла падения излучения. В случае исследования полиэфиров на германиевом кристалле глубину проникновения можно оценить как  $d_p \approx \frac{\lambda_0}{10}$ .

На рисунке 43 представлены полный диапазон ИК-МНПВО спектры пленок из индивидуальных полимеров ПГБ и ПКЛ и их смесей во всем диапазоне волнового числа, на котором были выделены три далеко отстоящих друг от друга характеристических участка (рисунок 43). Расчет  $d_p$  в выбранных диапазонах показал, что значения волновых чисел 2700-3150  $\text{см}^{-1}$  соответствуют глубине проникновения 0,3 мкм, т.е. фактически это поверхностный слой, 1300-1550  $\text{см}^{-1}$  – 1 мкм от поверхности и 400 – 900  $\text{см}^{-1}$  глубине 2,2 мкм.

Сравнивая ИК-МНПВО спектры каждой из сторон пленки в трех выбранных диапазонах и полученные «на просвет» ИК-спектры тонких пленок (10 мкм) разного состава (рисунки 44а, 44б, и 44в), можно судить о градиентном составе пленки по толщине в диапазоне 2,2 мкм с каждой стороны (поверхность к воздуху - поверхность к подложке). Высота максимумов характеристических полос этих спектров позволяет с точностью до 3-5% (массовых) определять состав пленок.

Уже из данных рисунка 43 видно, что МНПВО-спектры разных поверхностей одной и той же пленки отличаются друг от друга (спектры 2 и 3, рисунок 43).

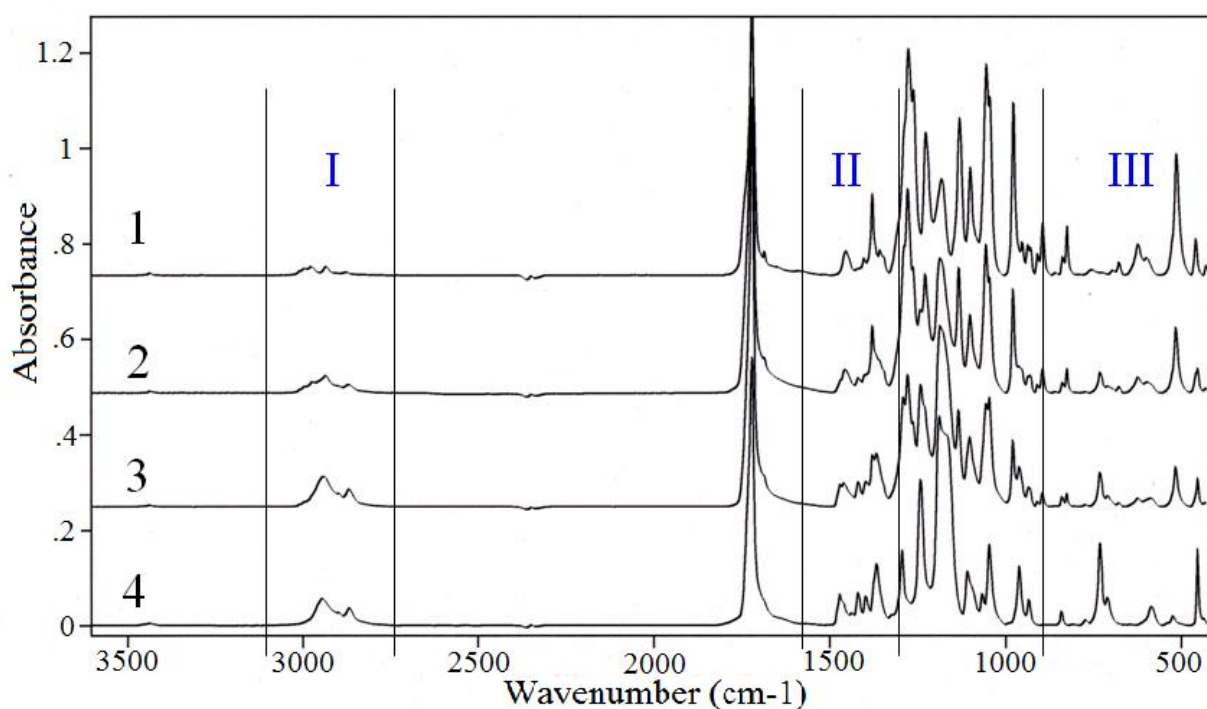


Рисунок 43 – ИК – МНПВО спектры пленок из ПГБ (1), ПКЛ (4) и их смеси 50:50 (2,3). 2 - поверхность к воздуху; 3 - поверхность к стеклу.

Участок спектра	диапазон $\omega$ , см-1	глубина проникновения
I	2700-3150 см-1	0,3 мкм
II	1300-1550 см-1	1 мкм
III	400 – 900 см-1	2,2 мкм

На рис 45 приведены спектры композиционных пленок трех исследованных составов в диапазонах 400 – 900см<sup>-1</sup>(45а), 1300-1550см<sup>-1</sup>(45б) и 2700-3150 см<sup>-1</sup>(45в) [198]. Если сравнить МНПВО-спектры пленки состава 50:50 с ее спектром «на просвет», то можно увидеть, что состав пленки на воздушной поверхности не соответствует заданному составу пленки. Ее спектр аналогичен ИК-спектру пленки 75:25, т.е. воздушно-поверхностный слой пленки содержит 75% ПГБ (рисунок 44). Сравнение МНПВО спектра пленки, полученного со стороны

подложки, со стандартными спектрами «на просвет» показывает, что поверхность пленки со стороны стекла содержит практически чистый ПКЛ (рисунки 44 и 45) [198].

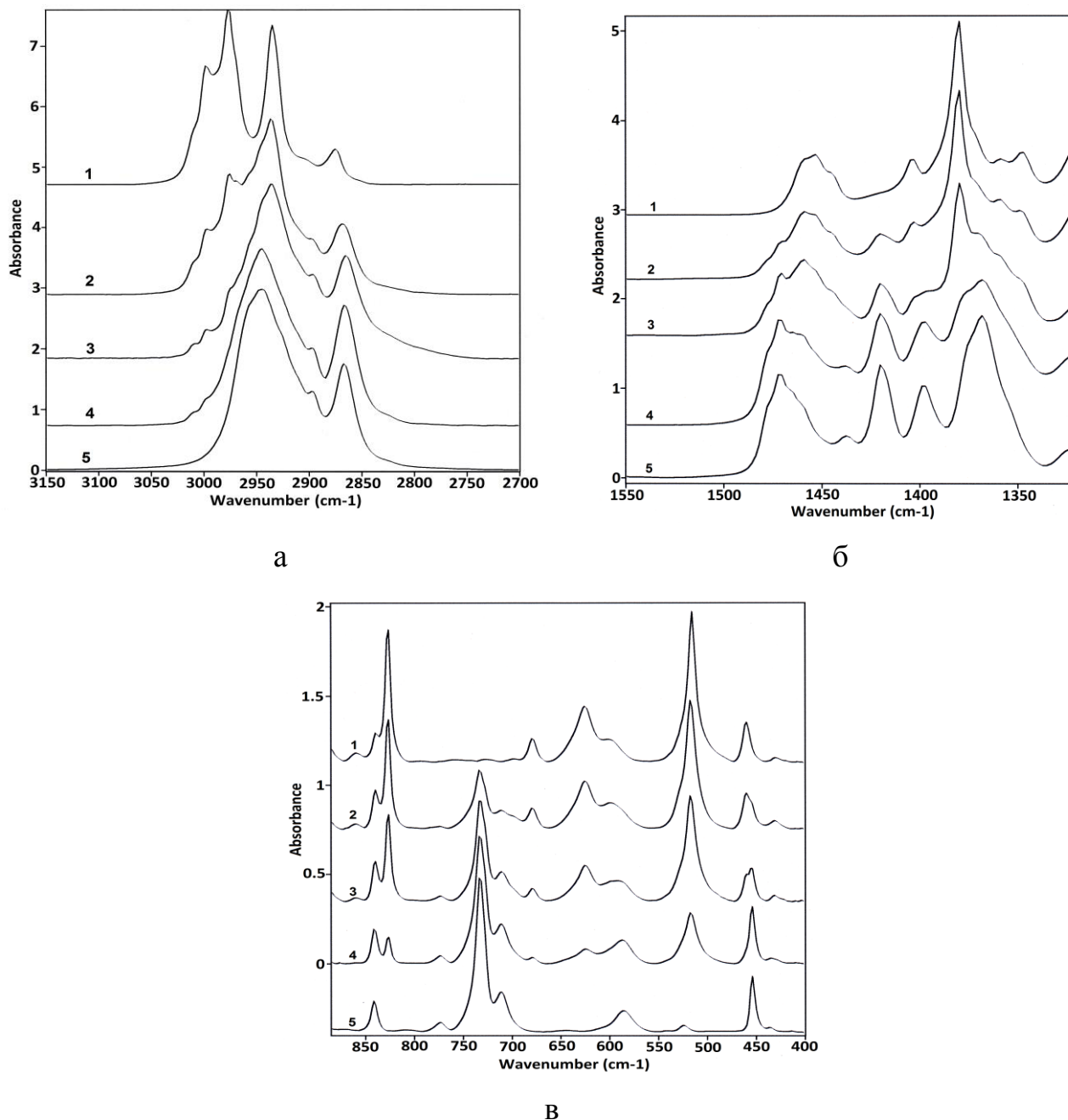
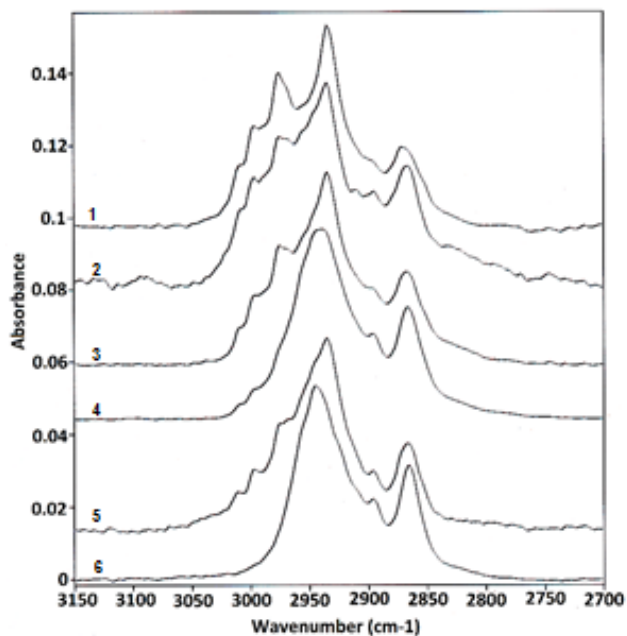
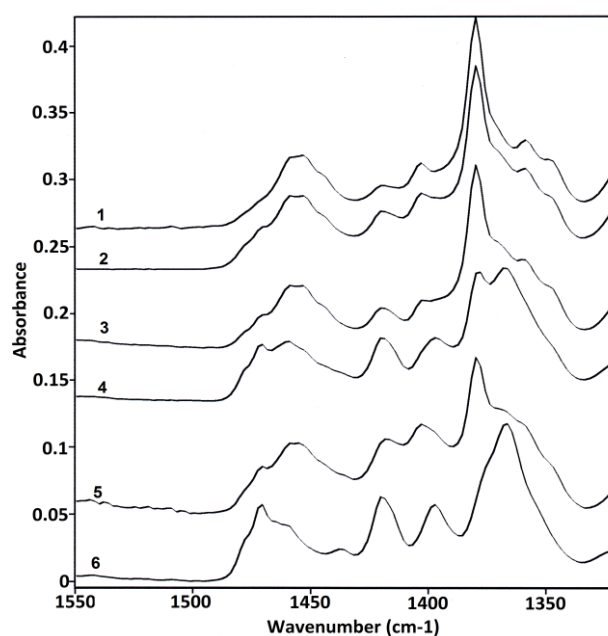


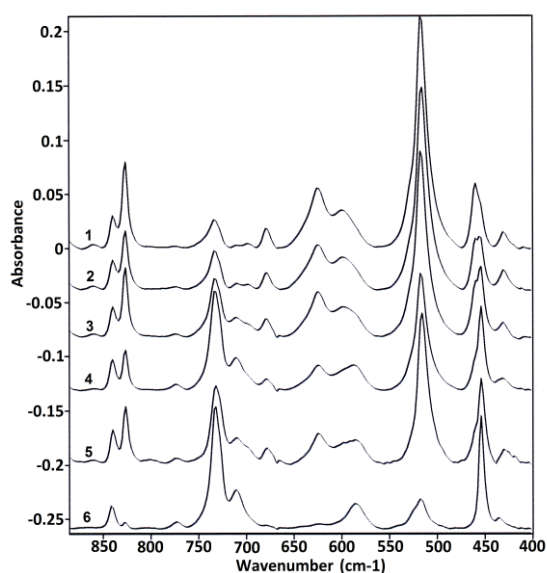
Рисунок 44 - ИК-спектры пленок толщиной 10 мкм из ПГБ(1), ПГБ-ПКЛ 75:25(2), 50:50(3), 25:75(4) и ПКЛ(5) в диапазоне  $\omega$  2700-3150 см<sup>-1</sup> (а), 1300-1550 см<sup>-1</sup>(б) и 400-900 см<sup>-1</sup> (в).



а



б



в

Рисунок 45 - ИК-МНПВО спектры поверхностей пленок состава ПГБ-ПКЛ 75:25 (1-подложка, 2-воздух); 50:50 (3-подложка, 4-воздух); 25:75 (5-подложка, 6-воздух) с глубиной проникновения в пленку 0,3 мкм (4а), 1 мкм (4б) и 2,2 мкм (4в).

Анализ результатов ИК-МНПВО спектроскопии позволил построить диаграмму, иллюстрирующую изменение градиента состава пленки по толщине в зависимости от соотношения ПГБ-ПКЛ (Рисунок 46).

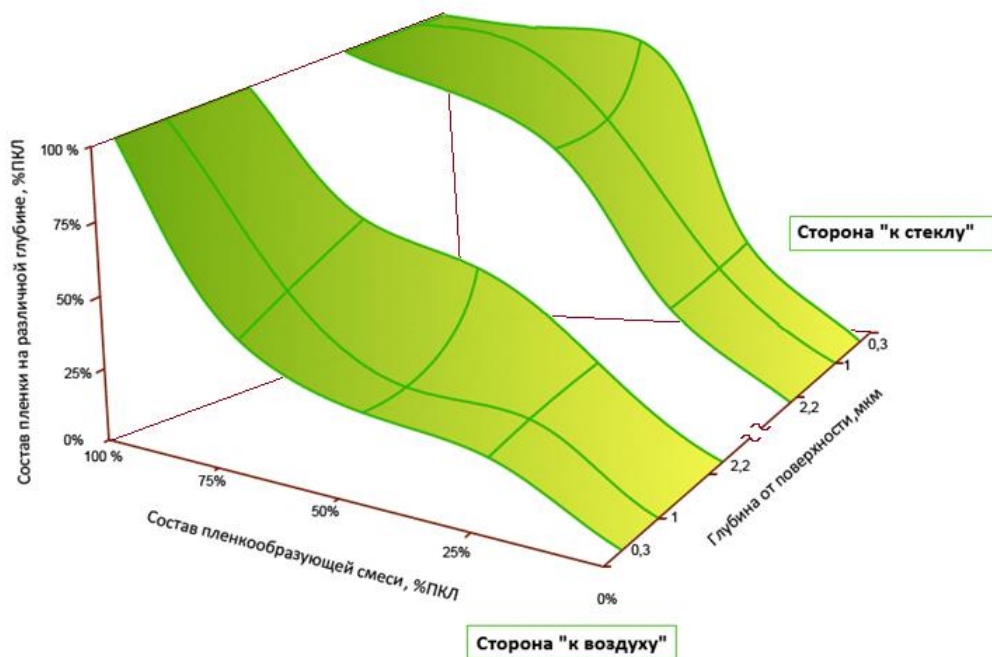


Рисунок 46 - Изменение состава плёнок из ПГБ и ПКЛ на различной глубине от поверхности плёнки.

Как видно из данных рисунка 46, лишь для пленки с высоким содержанием ПГБ состав на разной глубине пленки практически одинаков, в то время как при переходе от воздушной поверхности к внутренним слоям пленки и далее к поверхности, контактирующей с подложкой, содержание ПКЛ увеличивается.

Полученные результаты можно объяснить с помощью фазовой диаграммы (рисунок 20). В системе ПГБ – ПКЛ – хлороформ реализуется сложное аморфно-кристаллическое равновесие. При быстром испарении растворителя в поверхностном слое система попадает в область под бинодалью. Из раствора начинают выпадать кристаллы чистого ПГБ, формирующие поверхностный слой, в результате чего состав раствора изменяется и дальнейшее испарение растворителя происходит при другом соотношении ПГБ:ПКЛ. В результате относительная концентрация ПКЛ в растворе будет увеличиваться, а следовательно, постепенно будет возрастать содержание фазы обогащенной ПКЛ в составе плёнки.

Такой характер фазового разделения обуславливает возможность образования градиентной структуры по составу плёнки в направлении к подложке (рисунок 46).

Следует отметить, что изменение состава системы полимер-полимер-растворитель по толщине слоя в процессе испарения растворителя должно влиять

и на изменение морфологии пленки. Как показывают результаты электронной микроскопии, пористая структура пленки с соотношением полимеров 1:1, сохраняется по всей ее толщине (рисунок 47), однако поры вблизи воздушной поверхности имеют меньшие размеры, чем поры вблизи поверхности, контактировавшей со стеклом. Этот факт является результатом градиента концентраций по толщине слоя раствора, устанавливающегося в процессе испарения растворителя.

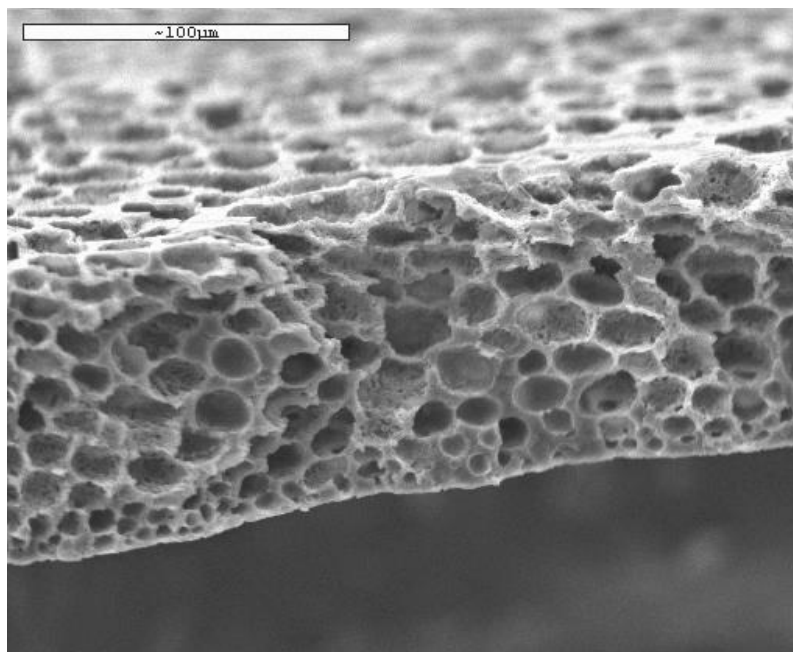


Рисунок 47 - Микрофотография скола пленки из смеси ПГБ и ПКЛ, полученной из смешанного раствора полимеров в хлороформе при соотношении ПГБ:ПКЛ 1:1.

Полуразбавленные растворы ПГБ, а также смешанные растворы на его основе имеют достаточно высокую вязкость, и могут быть использованы для формирования волокон, а также получения пленок не только методом полива, но и через щелевую фильеру. Кроме того, на их основе можно получать стабильные эмульсии типа вода-масло, содержащие водорастворимые биологически активные соединения.

### 2.2.7 Изучение кинетики биodeградации биологически активных пленок на основе полигидроксибутирата и поликапролактона

Для определения областей использования биodeградируемых полиэфигов различного строения, а также для создания материалов с заранее заданными сроками разрушения необходимо провести исследования кинетики их деградации. С этой целью был изучен процесс биodeградации пленок, полученных из ПКЛ, ПГБ и их смеси. Пленки были получены описанным выше способом из растворов в хлороформе.

Как показано в литературном обзоре, изучение кинетики деградации полимеров проводят, как правило, в модельных условиях (*in vitro*), так как анализ потери массы и структурных изменений порой небольшими образцами полимерных материалов *in vivo* методически затруднен. Однако в отсутствие микроорганизмов ПКЛ и ПГБ гидролизуются очень медленно, поэтому для сравнительного изучения устойчивости исследуемых пленок к биodeградации была исследована биodeградация пленок в почве при 20°C в аэробных условиях с использованием полива, имитирующего осадки.

Кинетика потери массы образцами пленок приведена на рисунке 48. Видно, что полученные в одинаковых условиях пленки различного состава разрушаются с разной скоростью, что определяется различием в электрофильности углеродного атома карбонильной группы и разной морфологией пленок. Анализ кривых потери массы в условиях щелочного гидролиза для образцов пленок, которые в исследуемом временном интервале полностью деградируют, показывает, что процесс потери массы в условиях биodeградации пленок характеризуется наличием двух, различающихся по скорости периодов.

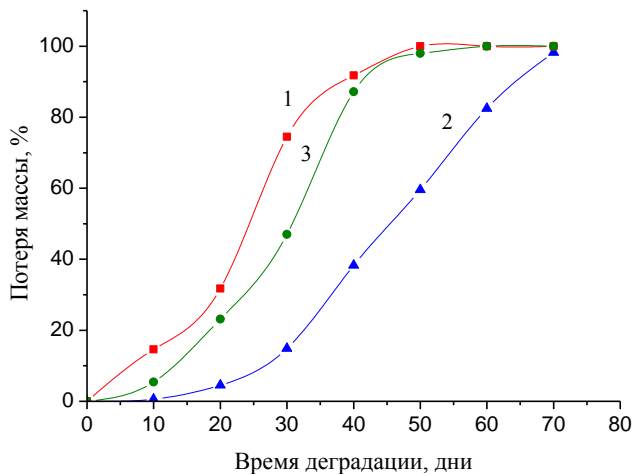


Рисунок 48 - Кинетика биodeградации пленок из ПГБ и ПКЛ; 1-ПГБ; 2-ПКЛ; 3-ПГБ:ПКЛ 1:1

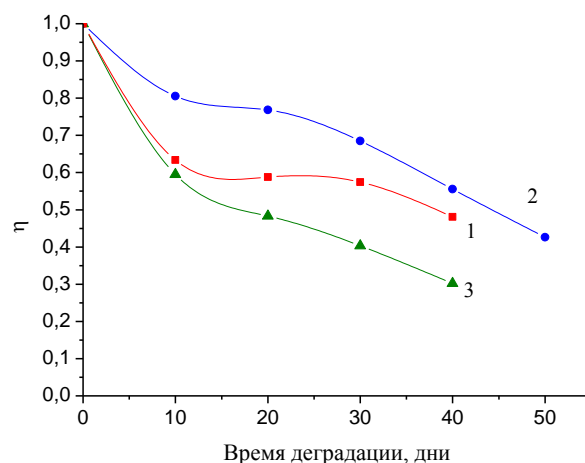


Рисунок 49 - Зависимость приведённой вязкости от времени деградации плёнок на основе ПГБ и ПКЛ; 1-ПГБ; 2-ПКЛ; 3-ПГБ:ПКЛ 1:1

Для исследования механизма деградации полиэфиров была изучена кинетика изменения приведенной вязкости (рисунок 49). Для достоверности определения вязкости были построены зависимости приведенной вязкости раствора полимера от концентрации, которые в пределах концентрации 0,1-0,3 г/дл имеют вид прямой линии, что позволило нам проводить измерения в широком диапазоне изменения вязкости.

Интересно отметить, что, несмотря на небольшую потерю массы, первый период характеризуется интенсивным изменением приведенной вязкости (рисунок 49). Такое уменьшение вязкости может быть связано только с существенным снижением молекулярной массы полимера.

Падение молекулярной массы наряду с медленным образованием водорастворимых продуктов гидролиза (на это указывает низкая скорость потери массы) позволяет сделать вывод о случайном (а не концевом) механизме гидролиза эфирных связей в исследуемых полиэфирах. По достижении определенных значений молекулярной массы этот механизм должен приводить к интенсивному образованию и вымыванию из полимерного материала низкомолекулярных продуктов гидролиза и быстрой потере массы (так называемый «burst» эффект). Начало этой стадии процесса гидролиза наблюдается примерно на 20 сутки.



Скорость гидролиза пленки из смеси ПГБ и ПКЛ (1:1) изменяется неаддитивно составу. Это может быть связано с пористой структурой материала. Для того чтобы выявить влияние пористости пленки смесового состава на кинетику ее деградации был исследован процесс потери массы пленками из индивидуальных полимеров, с искусственно созданной пористостью, полученных из 40%-ных водных эмульсий в растворах ПГБ, а также ПКЛ в хлороформе (рисунки 50, 51). Полученные результаты показывают, что появление в структуре пленок пор, увеличивающих поверхность контакта полимера со средой в процессе биодеструкции, приводит к снижению скорости деградации пленок. Полученные данные можно объяснить, предположив принципиально иной механизм разрушения непористых пленок из индивидуальных полимеров. Низкая скорость диффузии кислот из гидрофобного полиэфира, выделяющихся в процессе гидролиза, приводит к тому, что они накапливаются в структуре монолитных пленок и инициируют процесс гидролиза. Таким образом, непористые пленки разрушаются не только с поверхности образца, но и изнутри по механизму кислотного гидролиза.

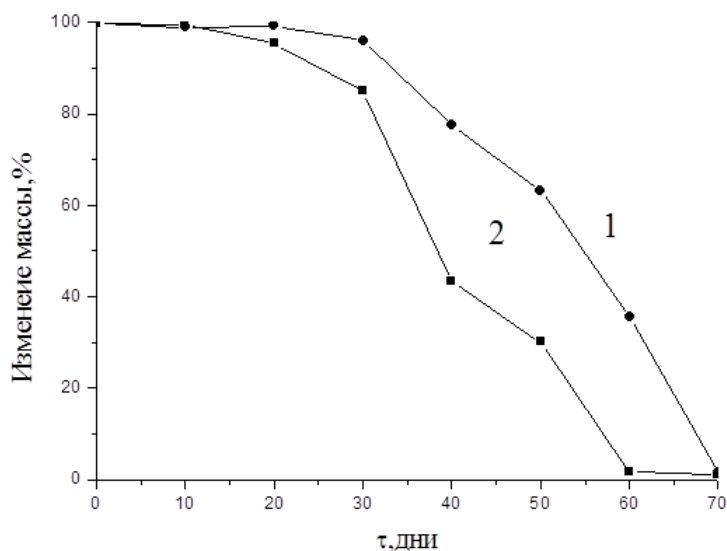


Рисунок 50 - Кинетика биодegradации пористой и непористой пленок из ПКЛ; 1-пористая; 2-непористая.

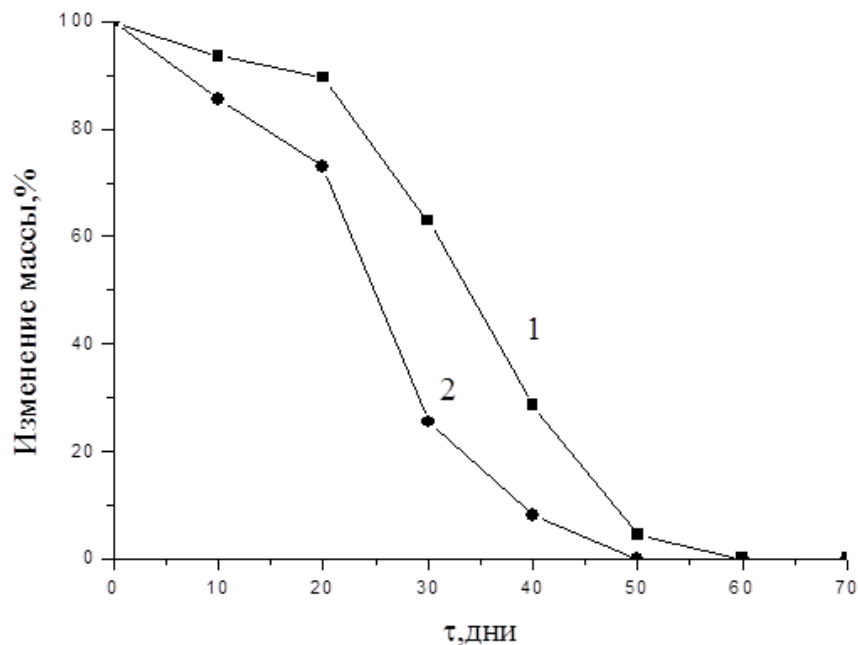


Рисунок 51- Кинетика биодegradации пористой и непористой пленок из ПГБ; 1- пористая; 2- непористая.

Поэтому высокая скорость биоразложения пленки состава ПГБ:ПКЛ 1:1, вероятно, связана не с появлением в процессе фазового разделения пор, а с аморфизацией ее структуры (снижением степени кристалличности и вызванным сокристаллизацией двух кристаллизующихся полимеров нарушением регулярности кристаллической структуры). Это предположение подтверждается результатами исследования теплофизических свойств пленок, подвергнутых биоразрушению (таблица 11).

Таблица 11 - Изменение теплофизических свойств пленок на основе ПГБ и ПКЛ в результате биодegradации

№ обр азц а	Состав пленки, %		Пористость	Время дегра- дации, сутки	Тпл, оС		ΔНпл, Дж/г	
	ПКЛ	ПГБ			ПКЛ	ПГБ	ПКЛ	ПГБ
1	-	100	-	0	-	179,3	-	72,4
2	-	100	-	30	-	178,8	-	66,8
3	-	100	пористая	0	-	177,9	-	72,0
4	-	100	пористая	40	-	178,3	-	70,6
5	100	-	-	0	58,7	-	49,9	-
6	100	-	-	30	61,1	-	50,5	-
7	100	-	пористая.	0	54,6	-	46,0	-
8	100	-	пористая	40	62,3	-	59,1	-
9	50	50	пористая	0	54,5	178,0	45,6	68,0
10	50	50	пористая	40	58,8	178,9	54,0	69,0

Основными результатами исследования теплофизических свойств пленок методом дифференциальной сканирующей калориметрии являются:

1. Введение дисперсной фазы, формирующей пористую структуру пленки практически во всех случаях приводит к понижению  $T_{пл}$  и  $\Delta H_{пл}$ , что свидетельствует о снижении степени кристалличности полимеров.

2. В процессе биodeградации происходит гидролиз эфирных связей полимеров в аморфных областях пленок, в результате чего увеличивается  $T_{пл}$  и  $\Delta H_{пл}$ . Это, в свою очередь, должно вызывать последующее замедление процесса биodeградации, что и наблюдается на кривых потери массы.

Таким образом, изменение состава пленок из смешанных растворов биodeградируемых полиэфиров, позволяет направленно изменять морфологию полимерного материала, их физико-механические свойства, поверхностный состав пленок и кинетику их биоразложения. Возможность регулировать свойства пленок является предпосылкой получения материалов медицинского назначения с заранее заданными свойствами. В последующих главах будет показана возможность создания на основе исследуемых систем биологически активных материалов с контролируемым выделением лекарственных веществ, а также биodeградируемых полимерных матриц, перспективных для использования в тканевой инженерии.

### **2.3. Получение биodeградируемых пористых полимерных матриц методом электроформования**

Биodeградируемые пористые материалы могут быть использованы для создания нового поколения изделий медицинского назначения - пористых полимерных матриц для тканевой инженерии [203, 204]. В основе тканевой инженерии лежит культивирование клеток на биodeградируемых полимерных матрицах с высокой удельной поверхностью. В предыдущей главе показана возможность получения на основе полигидроксibuтирата и поликапролактона пленочного материала высокопористая структура которого, сформирована в процессе фазового разделения. Настоящая глава посвящена разработке биodeградируемой матрицы, в которой пористая структура формируется иным

способом: путем создания волокнистого материала из ультратонких волокон методом бесфильтрного электроформования из растворов полигидроксibuтирата и его смесей с поликапролактоном.

По сравнению с установками капиллярного типа, в которых формовочный раствор подается с заданным расходом через капиллярное сопло и под действием электрических сил и образует ускоряющуюся и утончающуюся струю, на установке бесфильтрного электроформования NS-LAB 200 Nanospider™ вытягивание жидких струй осуществляется со свободной поверхности формовочного раствора. По этой причине один из важнейших для электроформования параметров формовочного раствора – вязкость играет особую роль в процессах поверхностного каплеобразования, преодоления сил внутреннего трения при вытягивании струи, гашения кавитации – процессах, которые обеспечивают саму возможность электроформования без использования дозирующих устройств.

Полигидроксibuтират– это природный полимер бактериального происхождения, который синтезируется несколькими видами прокариотических микроорганизмов в виде высокомолекулярного кристаллизующегося полимера [5]. Высокая молекулярная масса ПГБ обуславливает очень высокую вязкость его растворов в хлороформе. На рисунке 52 приведены реологические кривые растворов ПГБ в хлороформе в координатах зависимости  $\lg \dot{\eta} = f(\dot{\gamma})$ .

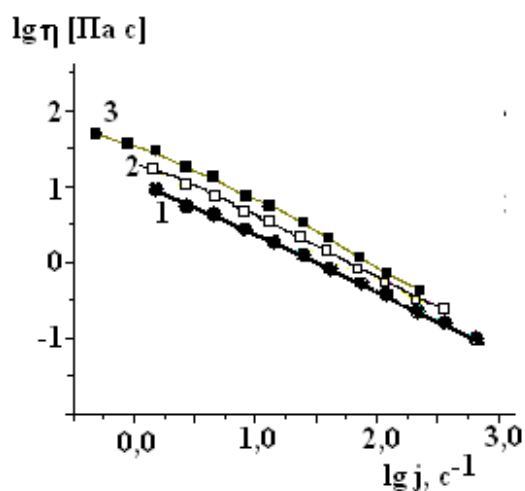


Рисунок 52 – Зависимость вязкости от градиента скорости сдвига растворов ПГБ в хлороформе. Концентрация полимера 3 (1), 4 (2) и 6 % (3).

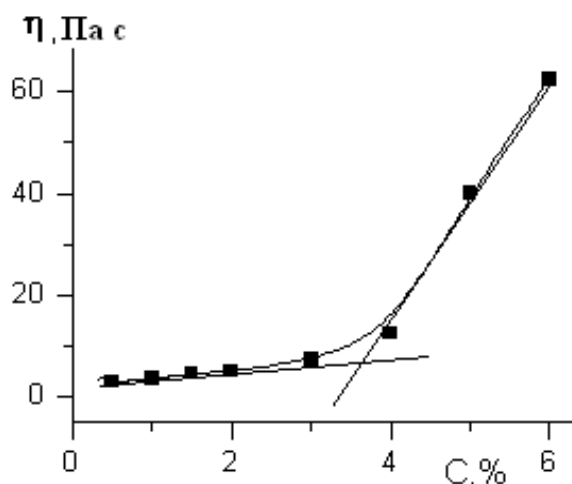


Рисунок 53 – Концентрационная зависимость начальной вязкости растворов ПГБ в хлороформе.

Как видно из рисунка 52, на реологических кривых в исследуемых пределах градиента скоростей сдвига отсутствует участок ньютоновской вязкости. В выбранном диапазоне скоростей сдвига для любой концентрации раствора, реологическая кривая представляет собой структурную ветвь кривой вязкости, форма которой определяется характером изменения структуры системы, в результате разрушения пространственной сетки зацеплений под влиянием деформирования. Начальная эффективная вязкость 3%-ного раствора ПГБ в хлороформе раствора достигает 9.15 Па·с, а энергия активации вязкого течения этого раствора, рассчитанная по уравнению Аррениуса-Френкеля из зависимостей  $\ln \eta = f(1/T)$ , полученных в интервале температур от 20 до 40°C, имеет низкое значение (26.7...кДж/моль). По-видимому, процессы структурирования в растворе приводят к образованию крупных ассоциатов сольватированных макромолекул, взаимодействия между которыми слабее взаимодействий между отдельными макромолекулами. Это является причиной того, что сдвиговые воздействия, а также увеличение энергии теплового движения легко разрушают структуру раствора полимера.

Из концентрационной зависимости вязкости растворов ПГБ (рисунок 53) определена область концентрации кроссовера – 3.5-4%.

Именно в этой концентрационной области начинает формироваться непрерывная сетка зацеплений, необходимая для стабильного струеобразования при электроформовании волокон. Исследование возможности электроформования 2-6%-ных растворов исходного ПГБ в хлороформе показало, что низкоконцентрированный 2%-ный раствор только распыляется, а при использовании более концентрированных растворов происходит слишком быстрое отверждение и обрыв тонких струй формовочного раствора. Электроформование бесфильтренным способом растворов столь низкой концентрации и высокой вязкости осуществить не представляется возможным.

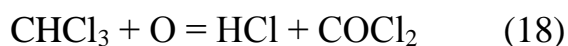
Для снижения вязкости формовочных растворов полимеров часто используют повышение температуры, но в случае растворов в таком летучем растворителе, как хлороформ, данный прием использовать нельзя, так как это существенно усложнит аппаратное оформление процесса формования и

повысит опасность производства. Поэтому для снижения вязкости растворов ПГБ целесообразно использовать полимер с меньшей ММ, который, в свою очередь, может быть получен путем частичной деструкции исходного ПГБ.

Известно, что сложноэфирные связи подвержены кислотному гидролизу. Учитывая, что водные растворы кислот не растворимы в хлороформе существует ограниченный набор кислот, которые могут быть использованы в качестве катализаторов процесса деструкции ПГБ. Так, например, в работе [205] для получения волокон на установке капиллярного электроформования в качестве растворителя ПГБ было предложено использовать формовочные растворы, содержащие муравьиную кислоту.

Помимо описанного в литературе метода гидролиза ПГБ в присутствии 10% муравьиной кислоты (МК) исследована возможность гидролиза полимера и снижения вязкости раствора в присутствии более сильного кислотного реагента - HCl.

Чистый хлороформ медленно изменяется в присутствии воздуха и под влиянием света, при этом выделяются едкие кислые пары, состоящие из хлорида водорода и фосгена [206]:



Поэтому хлороформ, который хранился в течение длительного времени, содержит HCl.

Для приготовления формовочных растворов использовали хлороформ, который хранился в течение различного времени. Содержание HCl, определенное методом титрования в неводных средах, изменялось в пределах 0.015 – 0.005%. Контроль за деструкцией полимера и вязкостью растворов проводили с использованием ротационной вискозиметрии с параллельным определением ММ полимера вискозиметрическим методом. Полученные результаты представлены на рисунках 54 и 55.

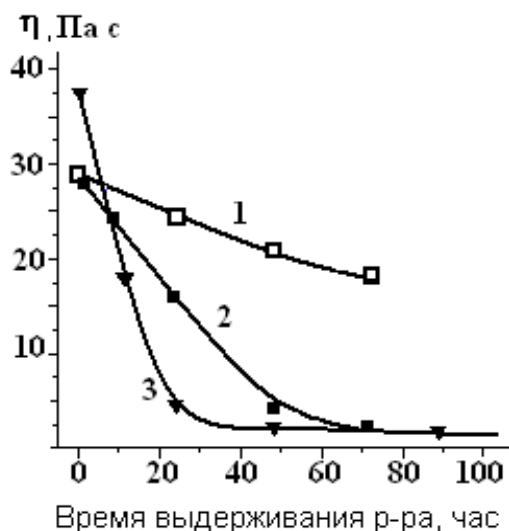


Рисунок 54 – Кинетика изменения вязкости 6%-ных растворов ПГБ в хлороформе, содержащих кислотный компонент 0.005 (1) и 0.015% HCl (2) и 10% МК (3).

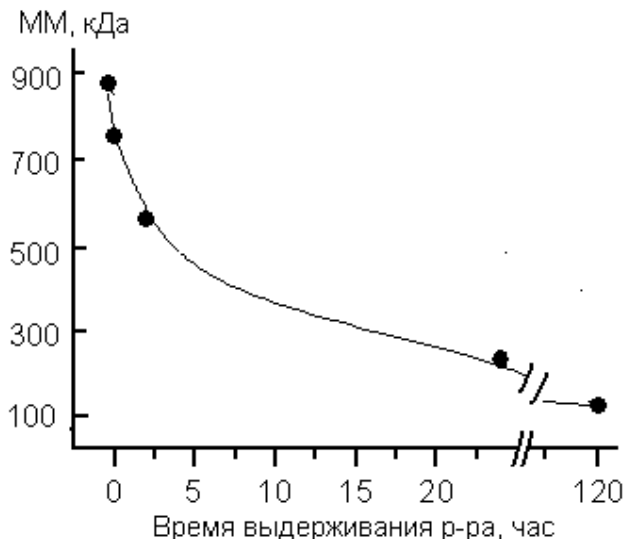
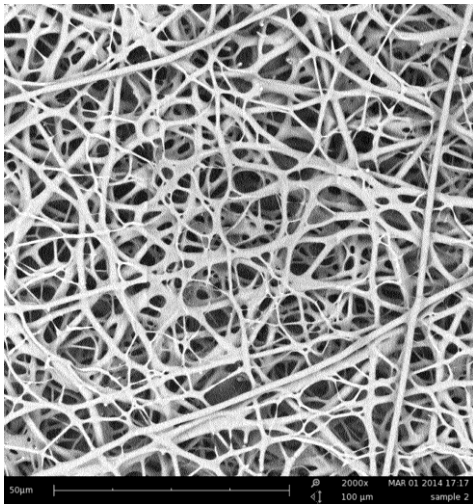


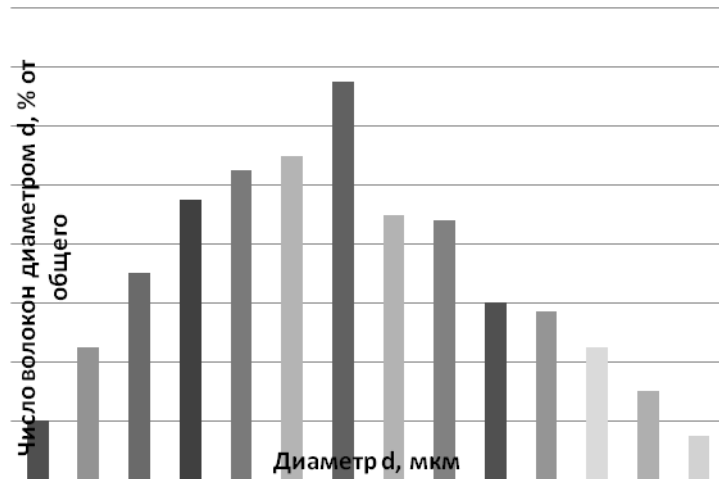
Рисунок 55 – Изменение MM ПГБ в процессе выдерживания растворов в хлороформе, содержащем 10% МК.

Как видно, при выдерживании всех исследованных растворов происходит снижение их вязкости, но в разной степени. Так, в присутствии 10% МК в течение 20 час вязкость падает с 42 до 2 Па·с, а в присутствии 0.015% HCl аналогичный эффект достигается за 60 час. Однако следует отметить, что концентрация HCl в хлороформе в 600 раз ниже, чем муравьиной кислоты. Закономерно, что с уменьшением содержания в растворе кислотного компонента снижение вязкости происходит с меньшей скоростью (кривые 1 и 2, рисунок 54). Данные рисунка 54, в частности, установленное снижение MM полимера с 860 до 115 кДа, показывают, что падение вязкости растворов в указанных условиях действительно обусловлено деструкцией полимера. Следует также отметить, что в процессе выдерживания 6%-ных растворов ПГБ в хлороформе, содержащих кислотные компоненты, они становились более прозрачными.

Как уже отмечалось, использование для электроформования 6%-ного раствора исходного ПГБ в хлороформе очевидно, из-за высокой вязкости, затрудняющей деформирование капли раствора в электрическом поле не представлялось возможным. При использовании менее вязких растворов, полученных путем выдерживания в присутствии 0.015% HCl, удалось сформовать волокна из ПГБ, диаметр которых, согласно данным рисунка 56, лежит в микрометровом интервале.



А



В

Рисунок 56 – Микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам волокон из 6%-го раствора ПГБ в хлороформе, содержащего 0.015% HCl.

Из рисунка видно, что полученные волокна имеют широкое распределение по размерам и множество склеек. Это обусловлено необходимостью формирования из низкоконцентрированных растворов, из-за чего растворитель не успевает полностью испариться и на подложке осаждаются неотвержденные волокна. Однако такая структура волокна обеспечивает достаточный объем пор для прорастания клеток при его использовании в тканевой инженерии.

Другим способом снижения вязкости раствора ПГБ может быть использование смешанного раствора ПГБ с другим биodeградируемым полиэфиром с меньшей молекулярной массой. Использование ПКЛ, с одной стороны, позволило снизить вязкость формовочной композиции, а с другой – повлияло на структуру формируемого нетканого материала. Приведенные в таблице 12 данные показывают, что замена 50% ПГБ на ПКЛ позволяет снизить вязкость до 2.5 Па·с.

Таблица 12 - Динамическая вязкость 6%-ных растворов ПГБ (980 кДа) и его смеси с ПКЛ в хлороформе.

№ п/п	Соотношение полимеров, %		Начальная вязкость $\eta_0$ , Па·с
	ПГБ	ПКЛ	
1	100	-	63.1
3	50	50	2.5
4	0	100	0.12



Из 6%-го раствора эквимассовой смеси полимеров в хлороформе, путем электроформования со свободной поверхности при следующих условиях: напряжение  $23 \pm 2$  кВт, расстояние до подложки 15 см, температуре  $25^\circ\text{C}$  и влажность в камере  $\sim 50\%$  были сформованы волокна (рисунок 57А) с бимодальным распределением по диаметру (рисунок 57Б): толстые и тонкие с диаметром до 5 мкм и  $\sim 500$  нм, соответственно.

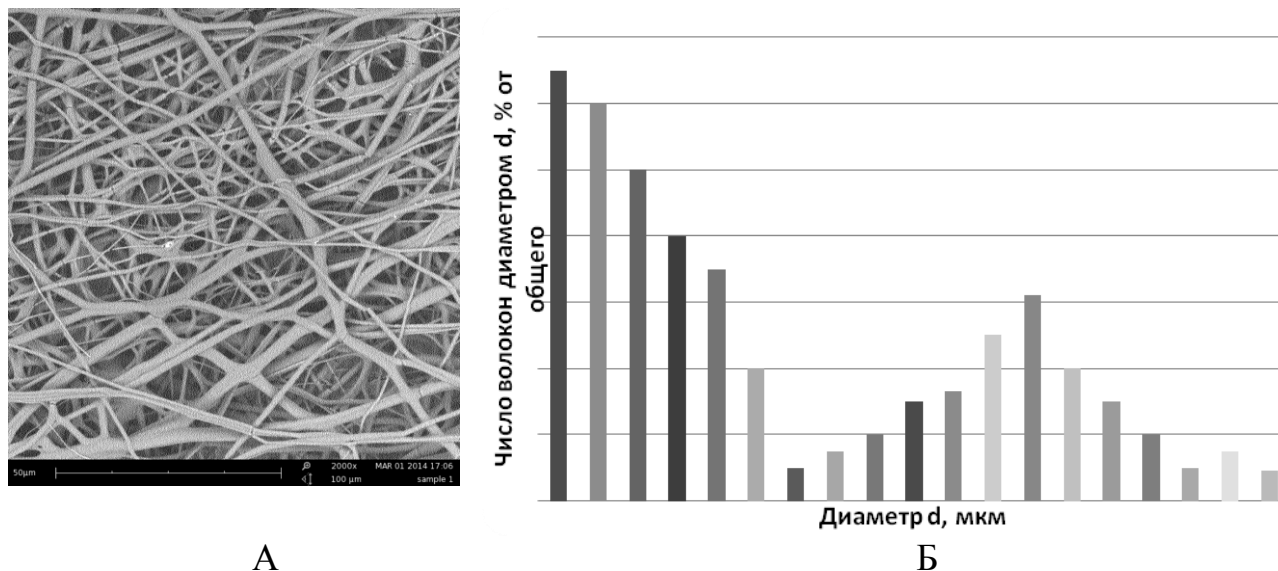


Рисунок 57 – Микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам волокон из 6%-го раствора ПГБ/ПКЛ в хлороформе.

Такая морфология волокнистого материала объясняется тем, что в процессе испарения растворителя в смешанном растворе ПГБ и ПКЛ происходит фазовое разделение, и воздействие электрического поля на систему приводит к формированию тонких волокон. Данная структура является оптимальной для создания биodeградируемых матриц для выращивания клеток живых тканей: тонкие волокна обеспечат прикрепление клеток к полимерной матрице, а толстые - возможности для их пролиферации (размножения и роста) [66, 207].

## 2.4 Разработка высокопористых биodeградируемых пленочных материалов с комплексным биологическим действием

Все более заметное место при лечении ран различной этиологии занимают перевязочные средства пленочного типа, требования к которым определяются как состоянием раны, так и стадией ее заживления. В случае создания композиционных пленок, включающих наряду с пленкообразующим полимером

биологически активные вещества различного типа, структура пленки должна обеспечить пролонгированное выделение лекарственных препаратов при отсутствии их инактивации в процессе иммобилизации [208]. Принципиальным при этом являются воздухо- и паропроницаемость пленочного покрытия, а также способность сорбировать экссудат. В свою очередь эти характеристики пленки зависят от ее надмолекулярной структуры, характера и размера пор. Растворимость ПКЛ и ПГБ в несмешивающемся с водой органическом растворителе (хлороформе, метилхлориде) позволяет включать в состав пленок водорастворимые соединения (белки, ферменты, антимикробные вещества) путем формирования из обратных эмульсий.

#### **2.4.1 Изучение паропроницаемости пленок из полимерных смесей ПГБ и ПКЛ**

Паропроницаемость является одним из основных требований к раневым покрытиям, призванным интенсифицировать процесс лечения повреждённой кожи за счёт создания оптимальной влажности на поверхности раны. Изучение паропроницаемости плёнок проводили по ГОСТ 22900-78. Предварительно плёнки были выдержанны на воздухе при относительной влажности 65% не менее 24 часов до постоянной массы. Для изучения кинетики испарения воды через поверхность плёнок были использованы следующие соотношения ПГБ-ПКЛ: 100:0, 0:100, 75:25, 50:50, 25:75.

Толщина плёнок, полученных из смешанных растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе, составила  $50 \pm 5$  мкм. Как видно из рисунка 58, паропроницаемость пленок в зависимости от состава изменяется неаддитивно, наименьшую скорость переноса воды обеспечивают плёнки из индивидуальных полимеров (кривые 1 и 2), паропроницаемость таких плёнок невелика и составляет  $1 \text{ мг/см}^2 \cdot \text{час}$  и  $1,4 \text{ мг/см}^2 \cdot \text{час}$  для материалов ПГБ и ПКЛ соответственно. Максимальная паропроницаемость, достигается при соотношении полимеров 50:50 (рисунок 59).

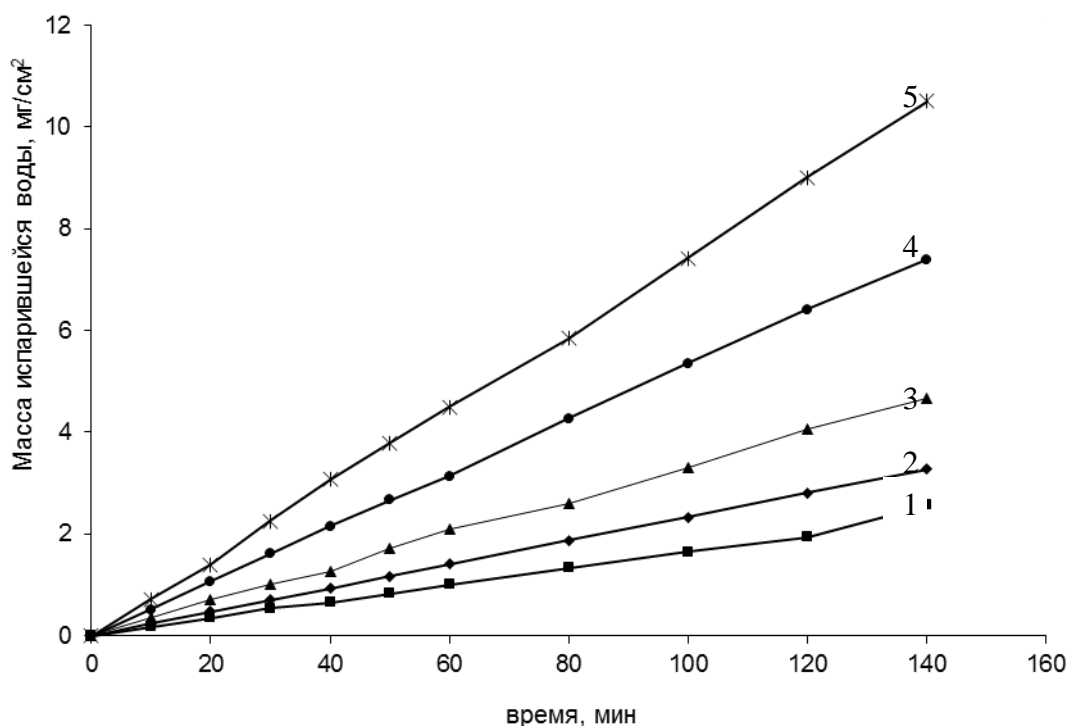


Рисунок 58 - Кинетика испарения воды через поверхность плёнок.  
 Состав плёнок ПГБ-ПКЛ: 1. 100:0; 2. 0:100; 3. 75:25; 4. 25:75; 5. 50:50.  
 Толщина плёнок  $50 \pm 5$  мкм.

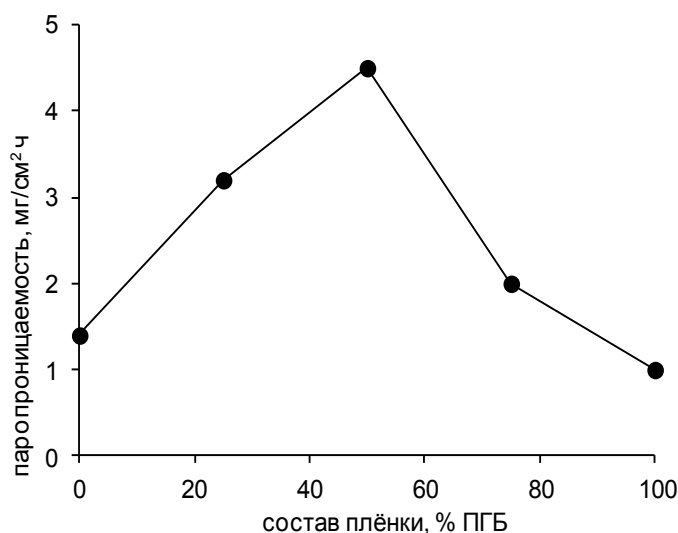


Рисунок 59 - Влияние состава плёнки на основе ПГБ и ПКЛ на паропроницаемость.

Наиболее близкой к оптимальной паропроницаемости раневых покрытий является пленка состава ПГБ-ПКЛ 50:50. Смешанные растворы ПГБ и ПКЛ, содержащие биodeградируемые полиэфир в соотношении 1:1 были использованы для получения формовочных композиций, содержащих биологически активные вещества.

## 2.4.2 Включение протеолитического фермента трипсина в структуру пленок из ПГБ и ПКЛ

Современные перевязочные материалы должны обладать целым комплексом свойств, среди которых: элиминация раневого содержимого, способность подавлять развитие инфекции, биосовместимость. На первой фазе раневого процесса – «стадии гидратации», патофизиологически обоснованным является использование протеаз, гидролизующих девитализованные ткани и тем самым ускоряющих очищение ран [209, 210]. Энзимные препараты способствуют физиологическому ходу воспалительного процесса, предотвращая его патологическое развитие. Тем самым предупреждается развитие хронических рецидивирующих воспалительных процессов, нередко индуцирующих аутоиммунные заболевания. Поэтому, для создания полимерного биосовместимого биологически активного раневого покрытия, были использованы формовочные композиции на основе растворов ПГБ в хлороформе, содержащие протеолитический фермент трипсин. Способ получения биологически-активных волокнистых и пленочных материалов из эмульсий водного раствора фермента в растворе полимера в несмешивающемся с водой органическом растворителе был разработан в работах [211,212]. Формовочные композиции получали путём эмульгирования раствора трипсина в 0,1М буферном растворе (рН=7,8) в растворе ПГБ в хлороформе. С целью изучения возможности регулирования кинетики выделения из биосовместимых плёночных покрытий протеолитического фермента в состав водной фазы вводили гидрофильный аминополисахарид хитозан с рН-зависимой растворимостью в воде.

Известно, что сшивка хитозана глутаровым альдегидом приводит к гелеобразованию в растворе хитозана и потери им растворимости в воде [213]. Хитозан и трипсин в формовочной композиции сшивали глутаровым альдегидом (ГА), который добавляли в эмульсию в виде 10% водного раствора. Соотношение ГА -  $\text{NH}_2$  группы хитозана выбирали на основании предварительных опытов по изучению скорости гелеобразования. Было выбрано соотношение 0,01 моль ГА/моль  $\text{NH}_2$ , при котором после добавления глутарового альдегида до завершения гелеобразования, система оставалась жидкой в течение 2 часов, что

обеспечивало возможность проведения технологических операций эмульгирования и обезвоздушивания. Полученные эмульсии выдерживали в течении 30 минут для удаления пузырьков воздуха. Формование плёнок проводили методом испарения растворителя из тонкого слоя формовочной композиции, сформированного с использованием щелевой фильеры с регулируемым размером щели (рисунок 60). Из пленок вырезали участки одинаковой толщины (измерение проводили микрометром с точностью  $\pm 2$  мкм) и анализировали сохранение ферментативной активности в результате иммобилизации и кинетику выделения белка.

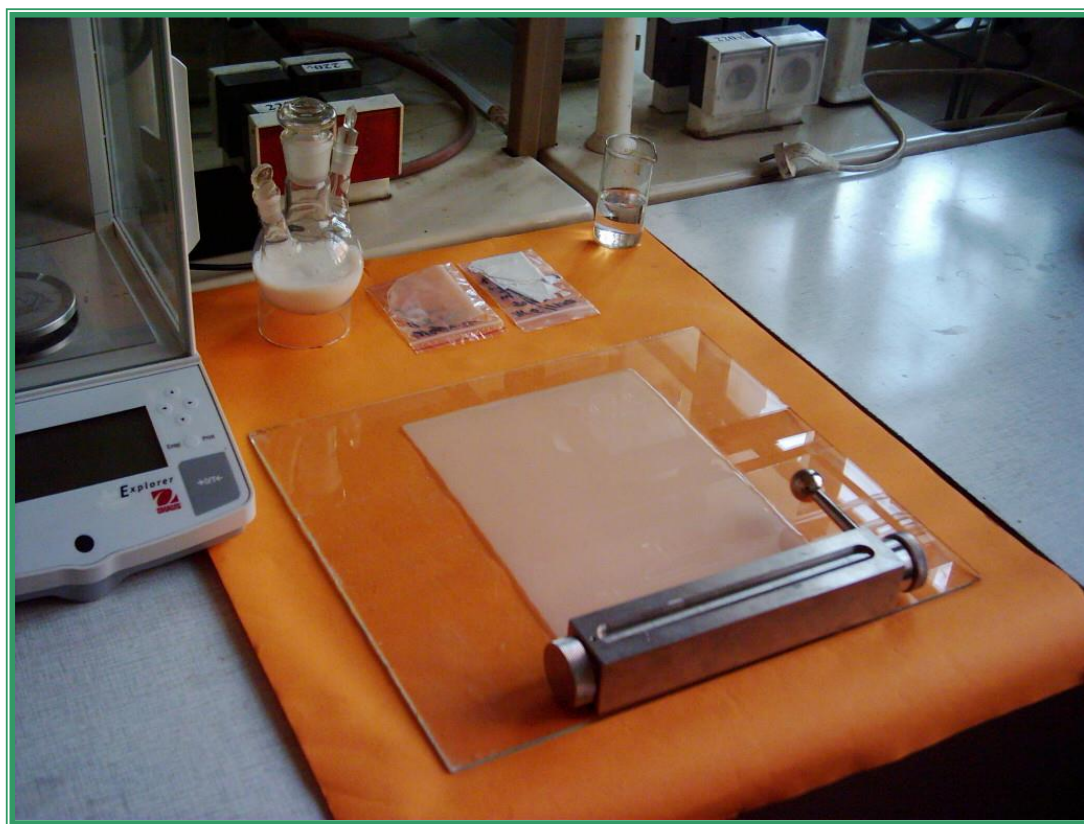


Рисунок 60 - Получение пленочных раневых покрытий

Активность трипсина определяли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза метилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАМЭ) при pH=7,8 и 25°C. За единицу активности принимали количество мкмоль N-бензоил-L-аргинина, образовавшегося в результате гидролиза БАМЭ за 1 минуту. Активность выражали в единицах на 1 мг белка, единицах на 1 г плёнки и в процентах от активности нативного фермента, включенного в пленку. Фармакокинетические свойства полимерных покрытий оценивали по скорости перехода активного трипсина в модельный раствор (0,9% раствор NaCl) в течение

6 часов. Дальнейшее определение не проводили ввиду возможной инактивации фермента.

Способность обратных эмульсий к сохранению агрегативной устойчивости определяется величиной межфазного поверхностного натяжения и соотношением вязкости дисперсной фазы и дисперсионной среды. При одинаковой концентрации белка, макромолекулы которого, как известно, обладают поверхностной активностью, и использовании одного и того же растворителя дисперсность и стабильность эмульсии определяется вязкостью дисперсионной среды. На основании изучения стабильности трипсиносодержащих эмульсий был определен нижний предел вязкости дисперсионной среды, обеспечивающий эмульсии стабильность во времени. Он составил 50 мПа·с, поэтому был приготовлен раствор ПГБ в выбранном растворителе (хлороформе) со значением динамической вязкости 77 мПа·с, концентрация раствора составила 4%. Формовочные композиции на основе этого раствора были использованы для получения плёнок, содержащих модифицированный и немодифицированный трипсин (таблица 13).

Таблица 13. Характеристика плёнок на основе полигидроксibuтирата, содержащих трипсин

№ образца	Состав плёнкообразующей смеси, %		Количество трипсина, введённого в плёнку,		Модификация трипсина в формовочной композиции	Активность иммобилизованного трипсина,	
	ПГБ	ПКЛ	мг/г	Е/г		Е/г	% от введённой
1	100	0	2	20	немодифицирован	8,5	42,5
2	100	0	2	20	модифицирован	6,2	31,0
3	50	50	2	20	немодифицирован	10,5	52,5

Как видно из таблицы 13, в результате иммобилизации, выявляемая активность трипсина в пленках составляет 31-52,5% активности введенного фермента, при этом, в большей степени потери активности в результате иммобилизации, наблюдаются при использовании глутарового альдегида, модификация которым может затрагивать активный центр фермента.

Эстеразная активность трипсина проявляется в наибольшей степени при его включении в структуру пленок из смеси ПГБ и ПКЛ (п.3, таблица 13). Как уже

отмечалось, при испарении растворителя из смешанного раствора ПГБ и ПКЛ формируется высокопористая структура с системой взаимопроникающих пор, которая должна была обеспечить интенсивный массоперенос. Однако, как видно из результатов, приведённых на рисунке 61, скорость десорбции белка из этой плёнки ниже, чем из остальных, включая плёнку, содержащую иммобилизованный фермент. Учитывая высокую выявляемую активность трипсина в плёнке, эти факты можно объяснить только адсорбцией амфифильных молекул белка из водных растворов на развитой внутренней поверхности гидрофобного полимера – ПГБ.

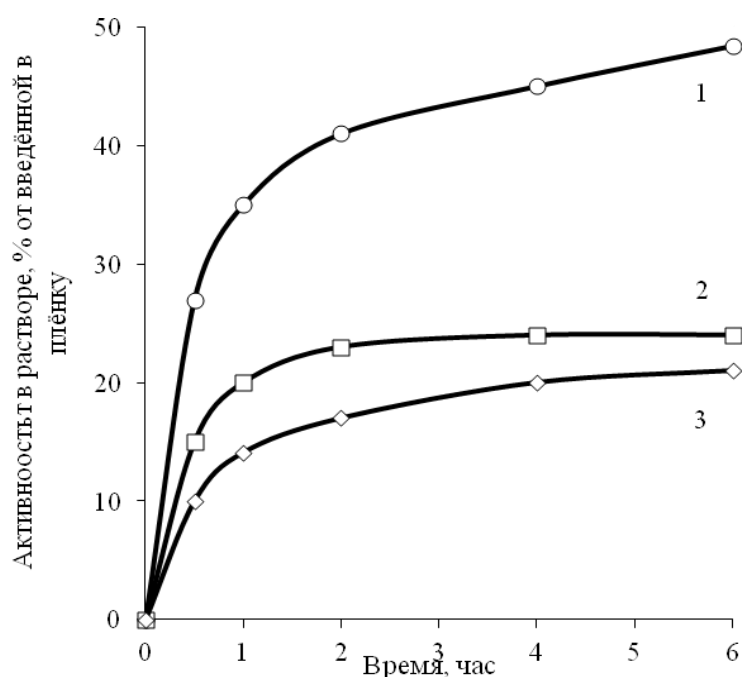


Рисунок 61. Кинетика выделения белка из плёнок на основе ПГБ в 0,9% раствор NaCl (40 мл/г плёнки). Номера кривых соответствуют номерам образцов таблицы 13.

Морфология такой пленки видна на микрофотографии ее скола (рисунок 62). Структура пленки, полученной из эмульсии, более пористая, чем структура пленки, полученной из раствора (рисунок 22), и характеризуется бимодальным распределением пор 20-50 мкм и 2-5 мкм.

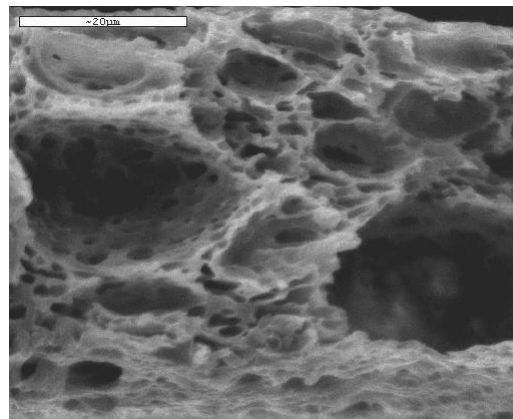
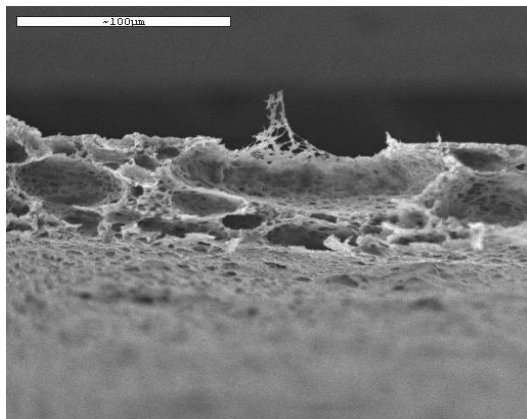


Рисунок 62 - Микрофотография скола пленки, полученной из эмульсии водного раствора протеолитического фермента трипсина в растворе смеси ПГБ (980 кДа) и ПКЛ (50:50) в хлороформе

### **2.4.3 Изучение процесса получения и свойств пленок с антимикробной и протеолитической активностью путем формования из эмульсий**

Совместное применение антибактериальных препаратов с протеазами не только повышает их биодоступность, но и снижает токсичность и побочные действия. Благодаря лизирующему действию ферментов облегчается проникновение антибактериальных препаратов в ткани, особенно в очаг воспаления. Для получения полимерных раневых покрытий с комплексным биологическим действием, которые помимо трипсина содержат антимикробные вещества, были выбраны формовочные композиции на основе смешанных растворов ПГБ и ПКЛ. В качестве антимикробных веществ были использованы водорастворимые соединения хлоргексидина биглюконат и пefлоксацин, которые вводили в водную фазу эмульсии, а также малорастворимый в воде антимикробный препарат – фуразолидон, который вводили в формовочную композицию в виде раствора в хлороформе. Из полученных эмульсий формовали пленки толщиной 50 и 200 мкм. Антимикробную активность образцов определяли по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus* методом диффузии в агар [214] по зонам ингибирования роста тест-культур микроорганизмов. Ферментативная и антимикробная активности пленок с соотношением пленкообразующих полимеров ПГБ-ПКЛ 50:50 приведены в таблице 14.



Таблица 14 - Биологическая активность пленок из смеси ПГБ и ПКЛ (50:50), содержащих трипсин и антимикробное вещество.

№ образца	Толщина пленки, мкм	Антимикробное вещество	Количество антимикробного вещества, % от массы пленки	Антимикробная активность		Протеолитическая активность		
				Зона задержки роста микроорганизмов, мм	Отношение площади зоны лизиса к площади образца	Введенная в пленку, Е/г пленки	пленки	
							Е/г пленки	% от введенной в пленку
1	200	ХГБГ	1,6	3,5	2,9	15,6	3,0	19,2
2	200	ПФ	1,6	10,3	9,2	15,7	24	15,2
3	200	ФЗ	2,4	3,2	2,7	15,0	3,3	22,1
4	50	ХГБГ	1,6	4,7	3,7	15,7	2,1	13,3
5	50	ПФ	1,6	10,4	9,4	15,7	4,5	28,6
6	50	ФЗ	2,4	5,5	4,6	15,0	5,9	39,1
7	200	-	-	-	-	14,3	1,2	8,1

Как видно из таблицы 14, все исследуемые образцы пленок обладали эстеразной и антимикробной активностью по отношению к тест культуре. Зоны задержки роста микроорганизмов превышали площадь образца в 3-10 раз. Более высокой ферментативной активностью обладали пленки, толщиной 50 мкм. Это связано с меньшим диффузионным путем для молекул фермента при их диффузии из пленок в раствор субстрата, так и для молекул субстрата при их диффузии внутрь тонких пленок, и, соответственно, меньшим влиянием диффузионных факторов на скорость гетерогенно-каталитической реакции. Следует особо отметить, что наибольшую активность проявляет трипсин, иммобилизованный в структуре пленок совместно с фуразолидоном, по сравнению с аналогичными пленками, содержащими другие антимикробные вещества. Этот факт может быть связан с тем, что фуразолидон и трипсин входят в состав разных фаз формовочной эмульсии, и поэтому не оказывают взаимного влияния на биологическую активность.

Результаты изучения антимикробной активности пленок после выдерживания в физиологическом растворе представлены на рисунке 63. Как видно из полученных данных, антимикробная активность пленки, содержащей пefлоксацин, через 4 часа выдерживания в физиологическом растворе составила

90% исходной активности пленки, а зона задержки роста микроорганизмов превышала область ингибирования тест-культур исходными образцами пленок, содержащими другие антимикробные вещества (п.5 таблица 5. диаграмма 2 рисунок 63).

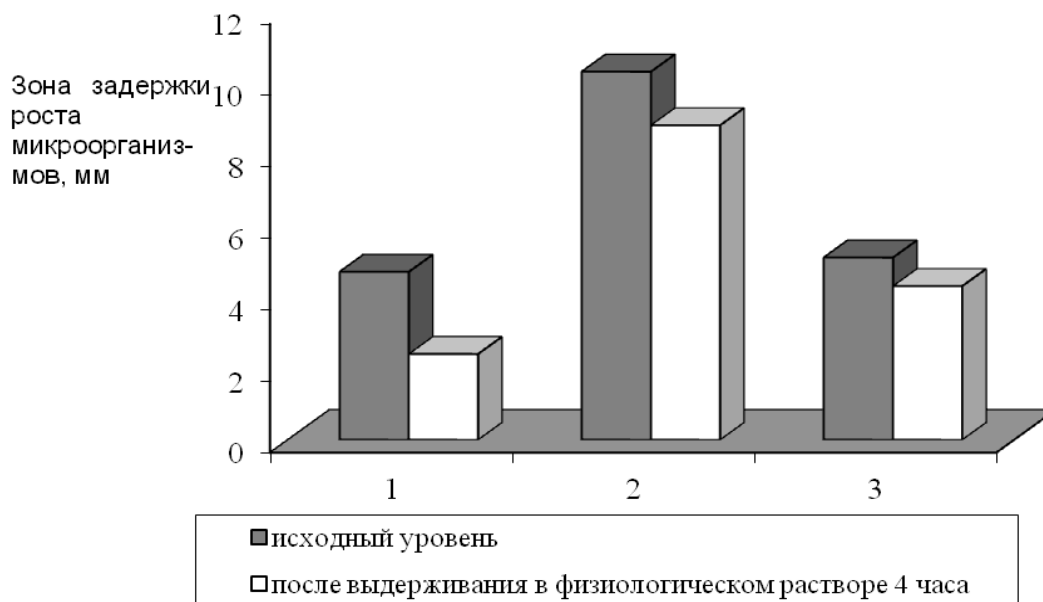


Рисунок 63 - Изменение антимикробной активности биологически активных пленок толщиной 50 мкм на основе ПГБ-ПКЛ 50:50 после выдерживания в физиологическом растворе. Пленки содержали трипсин и антимикробное вещество (1 – хлоргексидина биглюконат, 2 – пefлоксацин, 3 – фуразолидон)

Для определения фармакокинетических свойств полученных раневых покрытий была исследована кинетика выделения антимикробных веществ из пленок в физиологический раствор (рисунок 64), а также изменение антимикробной активности после обработки физиологическим раствором (рисунок 63). Полученные данные свидетельствуют о высокой скорости выделения водорастворимых антимикробных веществ (хлоргексидина биглюконата и пefлоксацина) в физиологический раствор. Более медленно антимикробное вещества высвобожалось из пленки толщиной 50 мкм, содержащей фуразолидон. При этом антимикробная активность через 4 часа выдерживания в физиологическом растворе составила 90% исходной антимикробной активности пленки (рис. 63).

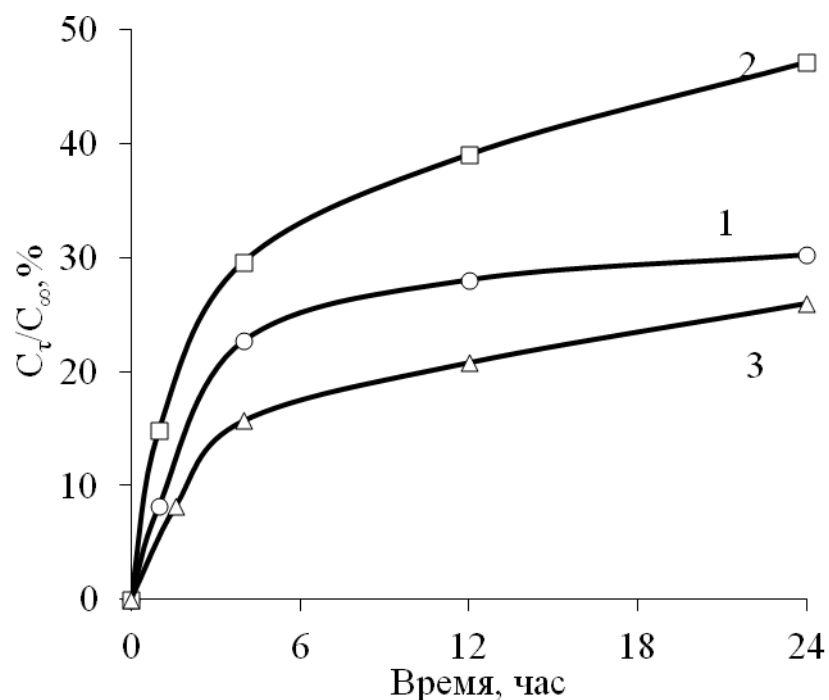


Рисунок 64 - Кинетика выделения антимикробных веществ из пленок ПГБ/ПКЛ (50%/50%) в физиологический раствор. Пленки содержали (1- хлоргексидина биглюконат, 2- пемфлосаксин, 3- фуразолидон).

Анализ полученных данных показал, что наибольшей антимикробной активностью обладает пленка ПГБ/ПКЛ (50:50), содержащая пемфлосаксин, однако скорость выделения этого антимикробного соединения существенно превышает скорость десорбции фуразолидона, растворимость в воде которого существенно ниже. Учитывая это факт, а также наибольшую активность трипсина, включенного в структуру пленки, содержащей фуразолидон, для получения раневого покрытия с комбинированным биологическим действием, может быть рекомендована формовочная композиция в виде эмульсии водного раствора трипсина в растворе ПГБ, ПКЛ и фуразолидона в хлороформе.

Введение биологически активных соединений не оказывает существенного влияния на теплофизические свойства пленок: несколько снижает теплоту плавления и изменяет температуру плавления ПГБ и ПКЛ. (рисунок 65, таблица 15), что может быть связано с незначительным уменьшением степени кристалличности.

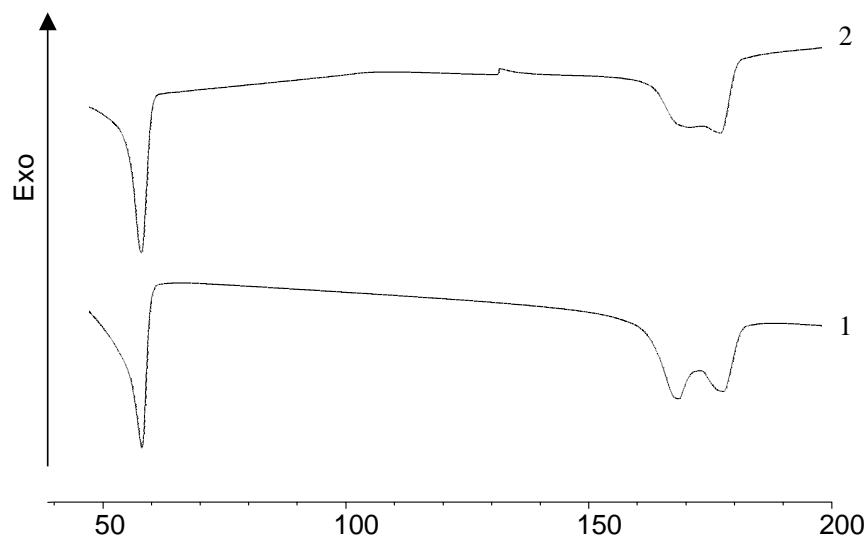


Рисунок 65 - Термограмма плёнок на основе смеси ПГБ и ПКЛ (50:50)

1 – плёнка не содержит биологически активных соединений,

2 – плёнка содержит 2% фуразолидона и 1% трипсина

Таблица 15 - Влияние БАС на теплофизические параметры плёнки из смеси ПГБ и ПКЛ (50:50)

№ образца	БАС, введенное в пленку	Температура плавления, 0С		Теплота плавления ΔНпл			
		ПГБ	ПКЛ	ПГБ		ПКЛ	
				Дж/г пленки	Дж/г ПГБ	Дж/г пленки	Дж/г ПКЛ
1	-	168,3 / 177,0	58,0	40,2	20,1	27,2	13,6
2	Трипсин, фуразолидон	170,2 / 177,1	57,9	39,2	19,6	21,8	10,9

Пленки из смеси ПГБ и ПКЛ, содержащие трипсин (1% от массы полимеров), а также пленки, содержащие 2% фуразолидона и 1% трипсина, хранились в запаянных пакетах в темном месте при комнатной температуре. Для пленок, содержащих трипсин и фуразолидон, изменения протеолитической активности в течение года не обнаружено, в то время, как активность нативного трипсина и трипсина, включенного в пленку не содержащую антимикробного вещества, в выбранных условиях хранения уменьшалась на 18 и 12% соответственно (Рисунок 66).

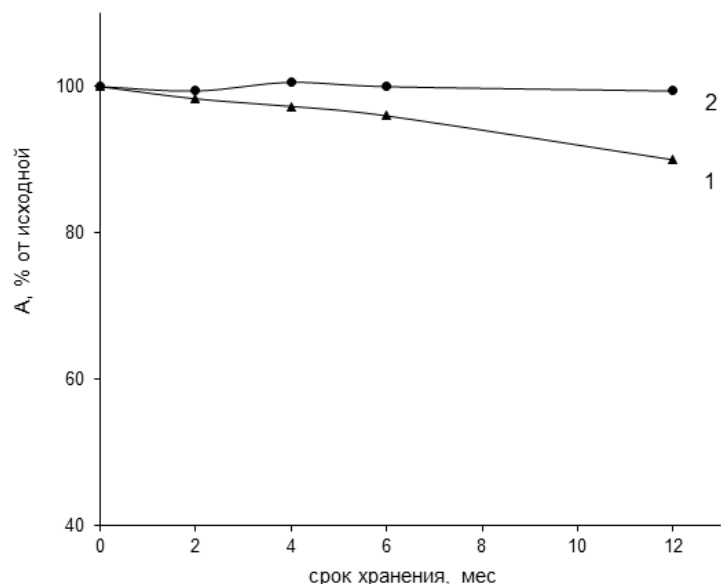


Рисунок 66 - Изменение активности трипсина в процессе хранения образцов при комнатной температуре ( $T = 20-25^{\circ}\text{C}$ ). БАС: 1- трипсин, 2– фуразолидон и трипсин.

На основании проведенных исследований был выбран состав полимерной композиции для получения пленок из смеси ПГБ и ПКЛ, представляющей собой эмульсию раствора трипсина в 0,1М трис-НСI буферном растворе ( $\text{pH}=7,8$ ), в растворе полимеров и фуразолидона в хлороформе. Эмульсию получали диспергированием при 600 об./мин, выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре и формовали на стекле пленки толщиной 50 мкм с использованием целевой фильеры с регулируемым размером щели. Состав формовочной композиции приведен в таблице 16.

Таблица 16 - Состав формовочной эмульсии для получения биологически активных пленок.

Дисперсионная среда			Дисперсная фаза	
Общая концентрация полимеров в хлороформе, %	Соотношение ПГБ-ПКЛ	Концентрация фуразолидона, %	Объемная доля, %	Концентрация трипсина в буферном растворе, мг/мл
3	1:1	0,08	5	10

\* \* \*

Таким образом, использование для получения биологически активных полимерных пленок формовочных композиций на основе биodeградируемых полиэфиров ПГБ и ПКЛ позволяет сформировать пористую структуру материала. Наличие структуры с взаимопроникающими порами обеспечивает материалу комплекс свойств: регулируемую кинетику выделения протеолитического

фермента, пролонгированную антимикробную активность. Разработанный полимерный материал может быть рекомендован для создания полимерных раневых покрытий при закрытии обширных поражений кожи и мягких тканей на длительные сроки с последующим резорбированием после выполнения защитной и заместительной функций. При применении таких пленок в качестве лекарственно наполненных раневых покрытий система взаимопроникающих пор обеспечит максимальный контакт раневого отделяемого, являющегося субстратом для иммобилизованных протеаз, с поверхностью пленочного покрытия и пролонгированное выделение трипсина и фуразолидона.

Для наработки образцов для проведения токсикологических испытаний был использован следующий состав раневого покрытия:

1. Полигидроксибутират (ПГБ) ММ 980 кДа	48,0%
2. Поликапролактон (ПКЛ)	48,0%
4. Трипсин	1,5%
5. Фуразолидон	2,5%

Из формовочных композиций, представляющих собой эмульсии водного раствора трипсина в смешанном растворе ПГБ, ПКЛ и фуразолидона в хлороформе методом формования через щелевую фильеру с последующими испарения растворителя были получены пленки толщиной  $50\pm 5$  мкм. Пленки были подготовлены для проведения технических и токсикологических испытаний: нарезаны на куски размером  $10\times 10$  см, запаяны в пакеты и подвергнуты стерилизации радиационным облучением, доза 25 кГр.

Токсикологические и технические испытания были проведены ФГУ Всероссийский научно-исследовательский институт медицинской техники. В Акте проведения технических испытаний отмечается, что образцы раневого покрытия на основе полигидроксибутирата, содержащие трипсин и фуразолидон, выдержали технические испытания. Санитарно-химические и токсикологические испытания показали, что опытные образцы раневых покрытий по токсикологическим и санитарно-химическим показателям нетоксичны и отвечают требованиям, предъявляемым к медицинским покрытиям на раны (Токсикологическое заключение № 231-06 от 12.07.2006; Акт АТНЛ 0.009.240.689).

### 3. Методическая часть

#### 3.1. Характеристика сырья и реактивов

В настоящей работе были использованы следующие реагенты:

Полигидроксibuтират – полимер микробиологического происхождения (ТУ 939-001-0269944) в виде порошка. Молекулярная масса 300 кДа, полученный в ОАО «Институт пластмасс им. Г.С. Петрова». Температура стеклования 15°C, температура плавления 175°C. Плотность 1250 кг/м<sup>3</sup>, степень кристалличности 80%.

Поли-ε-капролактон, с молекулярной массой 40 кДа. Плотность 1140 кг/м<sup>3</sup> при степени кристалличности 80%. Температура стеклования -60°C, температура плавления 63°C. Производство «Aldrich» (Швеция), гранулят.

Хлороформ – легколетучая жидкость с температурой кипения 61,15 °C, CHCl<sub>3</sub>, плотность 1489 кг/м<sup>3</sup>.

Метиленхлорид, дихлорметан, хлористый метилен, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ТУ 2631-009-444-3179-98. Температура кипения 40°C, плотность 1326 кг/м<sup>3</sup>. Производство ЗАО «Экос-1».

Трипсин – белок животного происхождения (из поджелудочной железы крупного рогатого скота), протеолитический фермент класса гидролаз. Кристаллический препарат производства «Serva», хорошо растворимый в воде. Относится к классу гидролаз К.Ф.3.4.21.4. Активность нативного фермента составляла 3,6 Е/мг.

Фуразолидон - ВФ 42-323-98, обладает выраженным противомикробными свойствами. Представляет собой желтый или зеленовато-желтый порошок, без запаха, слабо горького вкуса. Практически нерастворим в воде.

Хлоргексидина биглюконат – антисептик, белый кристаллический порошок без запаха. Плохо растворим в воде и спирте. Брутто-формула: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>10</sub>. Производство Лодзский фармацевтический завод «Польфа», Польша, 20% раствор, ФСП 42-0252-4278-03.

Пефлоксацин - средство противомикробного действия. Представляет собой белый кристаллический порошок Метилловый эфир N – бензоил – L – аргинин. Производство Усолье-Сибирский химфармкомбинат, Россия.

Хитозан – аминополисахарид, получаемый из панцирей ракообразных. макромолекулы состоят из случайно-связанных  $\beta$ -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Глутаровый альдегид - диальдегид глутаровой кислоты, жидкость желтоватого цвета с характерным запахом, брутто формула  $C_5H_8O_2$ .

Муравьиная кислота - прозрачная бесцветная жидкость со своеобразным резким запахом, брутто формула  $CH_2O_2$ , ГОСТ 5848-73

Уксусная кислота марки «ХЧ»; ГОСТ 61 – 75.

Дистиллированная вода -ГОСТ 6709 – 72.

### **3.2. Приготовление растворов полимеров**

Для приготовления раствора полимера навеску полимера, рассчитанную исходя из заданных концентрации и массы раствора, помещали в стеклянную колбу или бюкс, в зависимости от объема получаемого раствора, и добавляли необходимый объем растворителя, смесь перемешивали до полного растворения полимера. Для удаления нерастворившихся частиц проводили фильтрацию. В этом случае концентрацию раствора уточняли взвешиванием.

### **3.3. Определение вязкости разбавленных растворов полимеров**

Вязкость растворов полимеров определяли в термостатируемом при 25°C вискозиметре Уббелюде с диаметром капилляра 0,56 мм. Для этого измеряли время истечения чистого растворителя, причем отсчеты по секундомеру должны расходиться не более чем на 0,2 с. Вылив растворитель из вискозиметра, сушили вискозиметр, помещали в него 8,00 мл исходного раствора полимера с известной концентрацией и измеряли время истечения раствора полимера. Далее производили разбавление раствора непосредственно в вискозиметре, последовательно добавляя чистый растворитель, перемешивали и измеряли время истечения полученных растворов.

После проведения эксперимента рассчитывали удельную вязкость  $\eta_{уд}$  по формуле:



$$\eta_{y\partial} = \frac{(\tau - \tau_0)}{\tau_0} \quad (2)$$

где  $\tau$  – время истечения раствора, с;

$\tau_0$  – время истечения растворителя, с.

Затем рассчитывали приведенную вязкость по формуле:

$$\eta_{прив} = \frac{\eta}{C_i} \quad (3)$$

где  $C_i$  – концентрация раствора, г/дл.

На основании полученных данных строили графики зависимости приведенной вязкости от концентрации раствора и экстраполировали к нулевой концентрации. По отсекаемому на оси ординат отрезку определяли характеристическую вязкость  $[\eta]$ , а по уравнению Марка-Куна-Хаувинка молекулярную массу.

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (4)$$

$[\eta]$  – характеристическая вязкость дл/г;

$K$  – константа Хаггинса;

### 3.4. Формование пленок

Формование пленок проводили методом полива на стекле с использованием щелевой фильеры с регулируемым зазором или в чашках Петри путем испарения растворителя при комнатной температуре.

Массу формовочного раствора, необходимого для получения пленки с заданной толщиной рассчитывали по формуле:

$$m = s \cdot h \cdot \rho / C \quad (5)$$

где  $m$  – масса формовочного раствора, г

$s$  – площадь подложки, см<sup>2</sup>

$\rho$  – плотность полимера, г/см<sup>3</sup>

$C$  – концентрация раствора полимера, г/г

Пленки оставляли на открытом воздухе до постоянной массы.

### 3.5. Электроформование

Электроформование осуществлялось с использованием бесфильтровой лабораторной установки NS-LAB 200 Nanospider™, производство Чехия. Приготовленный формовочный раствор наливается в формовочный лоток объемом 20 мл. Электроформование на установке NS-LAB 200 Nanospider осуществляется с поверхности питающего электрода, который непрерывно омывается формовочным раствором. Под действием электрического поля струи раствора ускоряются в направлении заземленной подложки. Струи быстро утончаются за счет испарения растворителя, относительно удлиняются и оседают на подложке. Испаряющийся растворитель удаляется из камеры установки приточно-вытяжной вентиляцией (рис.67).

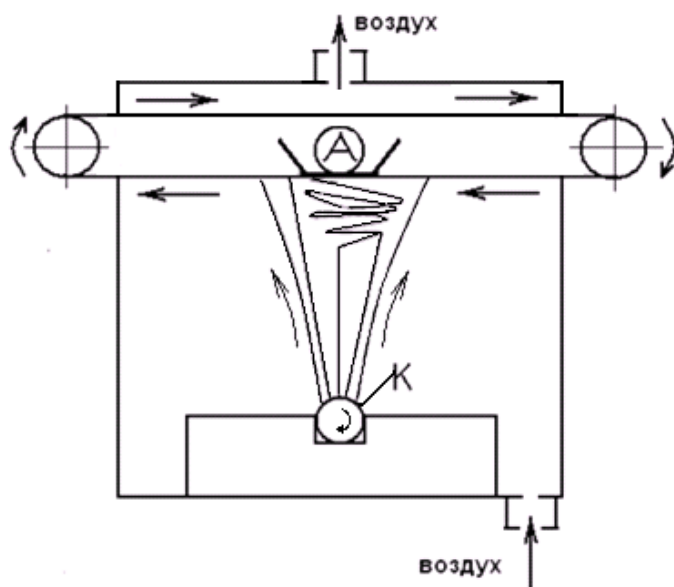


Рисунок 67. Схематическое изображение процесса бесфильтрового электроформования.

### 3.6. Приготовление растворов хитозана

Навеску хитозана рассчитывали с учетом содержания влаги в препарате и растворяли в 2%-ной уксусной кислоте. Использовали 2%-ные растворы в 2%-ной уксусной кислоте соответственно.

### 3.7. Построение фазовой диаграммы трехкомпонентной системы

#### ПГБ – ПКЛ - хлороформ

Фазовую диаграмму строили на основании значений точек помутнения растворов с одинаковой начальной концентрацией (2%) и разным соотношением полимеров.

Для построения фазовой диаграммы для шести составов смешанных растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе исследовали зависимость оптической плотности от концентрации раствора. С этой целью кварцевую кювету с раствором известного состава выдерживали при температуре 22°C. В процессе испарения растворителя кювету периодически взвешивали и на основании изменения массы определяли концентрацию, и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре марки «Genesys» (США) при длине волны 400 нм, используя в качестве контроля кювету с растворителем. За точку помутнения принимался состав смеси, соответствующий началу резкого увеличения оптической плотности раствора. На основании состава смеси, соответствующей точке помутнения, рассчитывали координаты точки фазовой диаграммы в трехкоординатной системе (треугольник Гиббса) полимер 1 – полимер 2 – растворитель.

### **3.8. Изучение морфологии пленочных образцов методом электронной микроскопии**

Морфологию сколов пленок на основе ПГБ и ПКЛ изучали с использованием метода электронной микроскопии на сканирующем микроскопе JSM-S300LV «JEOL» (Япония). Поверхность образцов напыляли золотом на приставке для напыления JFC-1100E «JEOL» (Япония).

### **3.9. Дифференциальная сканирующая калориметрия**

Теплофизические параметры пленок из ПКЛ, ПГБ и их смесей определяли на дифференциальном сканирующем калориметре DSC Q10 фирмы «TA Instruments». Дифференциальный сканирующий калориметр определяет температуру и тепловой поток, сопровождающие превращения материалов, как функцию времени и температуры. С помощью ДСК определяли температуру плавления и энтальпию плавления полимеров.

### **3.10. Изучение кинетики испарения растворителя и расчет коэффициента диффузии**

Кинетику испарения растворителя определяли периодическим взвешиванием чашки Петри с раствором полимеров, содержащим 2% раствор ПГБ, ПКЛ и смеси ПГБ-ПКЛ состава 50:50 в хлороформе. После достижения

остаточного содержания растворителя 12% (окончание линейного участка на кинетической кривой) определяли кинетику изменения толщины пленки.

Расчет коэффициентов диффузии проводили по формуле:

$$D = ((M \cdot \pi^{1/2} \cdot l) / (4 \cdot M_{\infty} \cdot t^{1/2}))^2; \quad (9)$$

Где D-коэффициент диффузии растворителя; M- вес раствора;  $M_{\infty}$ - вес абсолютно сухого полимера; l- толщина слоя раствора; t- время.

### **3.11. Изучение кинетики деградации пленок на основе ПГБ, ПКЛ и смеси состава 50:50**

Изучение кинетики деградации полимеров проводили в модельных условиях (in vitro). Гидролиз полимеров осуществляли в буферном растворе с pH 7,5 при температуре 37°C в течение 100 суток.

Кроме того, была исследована биodeградация ПКЛ, ПГБ и пленок состава ПГБ-ПКЛ 50:50 при 20°C в почве в аэробных условиях с использованием полива, имитирующего осадки.

### **3.12 Приготовление трис – HCl буфера**

0,01 г хлорида кальция (0,05 M)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и 6,05 г (0,2 M) трис – (гидроксиметил) – аминометана растворяли в 250 мл воды, pH доводили до необходимого значения с помощью концентрированной HCl, после чего разбавляли водой до 1 л.

### **3.13. Анализ активности нативного трипсина спектрофотометрическим методом**

К 3 мл 0,002 M БАМЭ в 0,2 M трис – HCl буфере (pH 7,8) в 1 см кварцевой кювете добавляли 200 мкл водного раствора трипсина (0,05 мг/мл) и фиксировали значения оптической плотности реакционной среды на спектрофотометре марки «Genesys» фирмы UV/VIS (США) во времени против аналогичной смеси, не содержащей фермент. Выделяющаяся в результате ферментативной реакции аминокислота бензоиларгинин (БА) поглощает при  $\lambda = 253$  нм.

### **3.14. Анализ активности иммобилизованного трипсина**

Активность трипсина определяли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза метилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАМЭ) в присутствии навески пленки, содержащей трипсин, при pH=7,8 и 25°C. За единицу активности трипсина (Е) принимали количество мкмоль N-бензоил-L-аргинина, образовавшегося в результате гидролиза БАМЭ за 1 минуту. Активность трипсина, включенного в пленку, выражали в единицах на 1г плёнки (Е/г) и в процентах от активности нативного фермента.

### **3.15. Изучение кинетики высвобождения трипсина из пленок в физиологический раствор**

Навеску измельченной пленки 0.06г помещали в бюкс и заливали 5 мл физиологического раствора. Через заданные промежутки времени (30 мин., 2 ч., 6ч., 12ч, 24ч.) отбирали пробы ( $V_{пр} = 0,2$  мл) и измеряли активность трипсина как описано в п. 3.13.

По полученным данным строили графики зависимостей  $C_{\tau} / C_{\infty} = f(\tau)$ , где  $C_{\tau}$  –концентрация активного трипсина в физрастворе в момент времени  $\tau$ ,  $C_{\infty}$  - гипотетическая концентрация в физрастворе всего трипсина, содержащегося в пленке.

### **3.16. Изучение кинетики высвобождения из пленок антимикробных веществ**

Концентрацию антимикробных веществ в физиологическом растворе, в процессе выделения из композиционных пленок, анализировали путем измерения оптической плотности на спектрофотометре марки «Genesys» UV/VIS (США) при длинах волны 367 нм (фуразолидон), 253 нм (хлоргексидина биглюконат) и 270 нм (пемфлоксацин).

### **3.17. Определение антимикробной активности**

Анализ антимикробной активности образцов пленок проводили на биологическом факультете МГУ им. Ломоносова. Проверка антимикробного действия образцов осуществлялась методом диффузии в агар [213] и в соответствии с Методическими указаниями по лабораторной оценке, антимикробной активности текстильных материалов, содержащих антимикробные препараты МЗ СССР (Москва, 1984 г.) по отношению к

грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus*. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA).

### **3.18. Получение формовочных эмульсий**

Для получения эмульсий водных растворов биологически активных соединений в растворе полимеров в хлороформе в двугорлую колбу заливали необходимое количество раствора ПКЛ и ПГБ в хлороформе. При перемешивании (600 об/мин) добавляли рассчитанный, исходя из заданной объемной доли, объем водной фазы и диспергировали в течение 20 минут.

### **3.19. Изучение паропроницаемости плёнок**

Изучение паропроницаемости плёнок проводили по ГОСТ 22900-78. Предварительно плёнки были выдержанны на воздухе при относительной влажности 65% не менее 24 часов до постоянной массы.

### **3.20. ИК-спектроскопия, методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения**

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Bio-Rad (Digilab) FTS-40 при разрешении  $4 \text{ см}^{-1}$ . Обработку спектров (нормирование, коррекцию базовой линии) проводили, пользуясь пакетом программ Win-IR v. 4 (Bio-Rad, Digilab Division). Исследуемые образцы помещались в спектрометр в непосредственный контакт с германиевой призмой. Угол падения ИК-излучения составлял  $60^\circ\text{C}$  и превышал критический угол падения, что приводило к полному внутреннему отражению ИК-излучения.

### **3.21. Динамо-механический анализ**

Метод ДМА был использован для исследования зависимости механических и вязкоупругих свойств пленок от температуры при воздействии периодических нагрузок. Термомеханические исследования проводились на термоанализаторе ДМА/SDTA 861 фирмы Metler (Toledo) при скорости нагрева  $5 \text{ К/мин}$ , максимальной нагрузке  $5\text{Н}$ , частоте нагружения  $1 \text{ Гц}$ .

### **3.22. Определение деформационно-прочностных характеристик пленок**

Деформационно-прочностные характеристики пленок с известной толщиной определяли при комнатной температуре без предварительной вентиляции образцов на универсальной разрывной машине AGS-10 kNG “Shima-dzu” (Япония), оснащенной программой PlasticTensileTest, version 1.71 “MessphysikLaborgerdtegesGmbH” при скорости растяжения 20 мм/мин. Длина рабочей части образцов составляла 30 мм, ширина образцов 5.0 мм. Проводили не менее 10 параллельных измерений каждого образца пленки. Испытание проводили в ИСПИМ им. Н.С. Ениколопова РАН.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены закономерности структурообразования в полимерных системах на основе растворов полигидроксибутирата и поликапролактона в общем растворителе и их влияние на надмолекулярную и пористую структуру биodeградируемых полимерных пленок медико-биологического назначения.
2. Получена фазовая диаграмма системы ПГБ – ПКЛ – хлороформ и определена необходимая для переработки из растворов область составов, в которой исследуемая система гомогенна.
3. Показано, что тип морфологии композиционных пленок из ПГБ и ПКЛ, полученных испарением растворителя, определяется соотношением полимеров, природой растворителя и зависит от молекулярной массы полигидроксибутирата.
4. Установлен градиентный состав пленок, полученных в результате испарения растворителя из смешанных растворов ПГБ и ПКЛ в хлороформе. Предложен механизм формирования градиентного состава пленки от подложки к воздуху при разном соотношении полимеров.
5. Показана возможность получения методом электроформования бездефектного волокнистого материала из растворов в хлороформе высокомолекулярного ПГБ и ПКЛ с ММ 50 кДа. Показано, что фазовое разделение приводит к получению волокнистого материала с бимодальным распределением волокон по толщине.
6. Разработаны композиционные пленки медико-биологического назначения на основе биodeградируемых полимеров ПГБ и ПКЛ, обладающие протеолитической активностью и пролонгированным антимикробным действием. Получено заключение ФГУ Всероссийский научно-исследовательский институт медицинской техники о соответствии разработанного материала санитарно-техническим требованиям, предъявляемым к раневым покрытиям.



## Список сокращений

ПГБ – полигидроксibuтират

ПКЛ- поли-ε-капролактон

БАС – биологически активные соединения

ИК-МНПВО – инфракрасная спектроскопия многократного нарушенного полного внутреннего отражения

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ПГ – полигликолид

ПЛ – полилактид

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПГВ – полигидроксивалериат

ММ – молекулярная масса

ТГФ – тетрагидрофуран

ПТМК – политриметиленкарбонат

ТМК – триметиленкарбонат

ГА- гидроксипатит

ПА – полиамид

ДМА – динамо-механический анализ

МК - муравьиная кислота

ГА – глутаровый альдегид

БА – бензоиларгинин

БАМЭ - метиловый эфир N-бензоил-L-аргинина

## Список литературы

1. Aremu, M.O. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) from cassava starch hydrolysate by *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 / Aremu, M.O, Layokun, S.K., Solomon, B.O. // American journal of scientific and industrial research.-2010.- №1(3).- P. 421-426.
2. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы:мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов /Т.Г. Волова // Журнал сибирского федерального университета. Биология, ч. 2. -2014.- т. 7.- С. 103-133.
3. Sasikala C. H., Biodegradable polyesters / Sasikala C. H., Ramana C. V. // Adv. Appl. Microbiol. – 1996. – Т. 42. – P. 97-218.
4. Fengyu Su. Crystal structure and enzymatic degradation of poly (4-hydroxybutyrate) / Fengyu Su , Tadahisa Iwata , Fumio Tanaka ,Yoshiharu Doi // Macromol. – 2003. – Т. 36. – №. 17. – С. 6401-6409.
5. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая – Красноярск: Группа компаний «Платина», 2006– 288 с.
6. Allison, J. Pieja. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria / Allison J. Pieja, Katherine H. Rostkowski, Craig S. Criddle// Microbial Ecology .-2011.- V. 62.- I 3.-P. 564-573.
7. Кильдеева, Н.Р. Биодegradируемые полимеры и их использование в медицине. Конспект лекций: учебное пособие/ Н.Р. Кильдеева, М.А. Бычук – М.:МГУДТ, 2014.- 67с.
8. Barham, P. J. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate/ Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., Holmes, P. A. // J. Mater. Sci. -1984.- Т. 19.- P. 2781-2794.
9. Righetti, M.C., Lorenzo M.L. Melting temperature evolution of non-reorganized crystals. Poly(3-hydroxybutyrate)/ M.C. Righetti, M.L. Lorenzo // Thermochimica Acta. -2011.- V. 512.-№ I.-P.59-66.

- 10.** Izumi, C.M.S. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/ Celly M.S. Izumi, Marcia L.A. Temperini // *Vibrational Spectroscopy*.-2010.- V. 54, I. 2.- P.127-132.
- 11.** Shanks, R.A. Comparison of reversible melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) using quasi-isothermal and other modulated temperature differential scanning calorimetry techniques/ R.A. Shanks, L.M.W.K. Gunaratne // *J. Therm. Anal. Calorim.*- 2011.- V. 104, I.3.-P.1117-1124.
- 12.** Spieckermann, F. Plasticity and X-ray Line Profile Analysis of the semicrystalline polymer poly(3-hydroxybutyrate)/ Spieckermann, F., Wilhelm H., Schafler E. et al. // *Journal of Physics: Conference Series*.- 2010. – T. 240. – №. 1. – P. 012146.
- 13.** Hoshina, H. Isothermal crystallization of poly(3-hydroxybutyrate) studied by terahertz two-dimensional correlation spectroscopy/ Hiromichi Hoshina, Shinya Ishii, Yusuke Morisawa et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 2012. – T. 100. – №.1.– P.011907.
- 14.** Bastioli C. (ed.). Handbook of biodegradable polymers. – iSmithers Rapra Publishing, 2005.
- 15.** Spyros, A. <sup>1</sup>H NMR Imaging Study of Enzymatic Degradation in Poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for Preferential Degradation of the Amorphous Phase by PHB Depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei*/ Spyros A., Kimmich R., Briese B.H., et al.// *Macromol.* – 1997. – T. 30. – №. 26. – P. 8218-8225.
- 16.** Bonartseva, G.A. Aerobic and anaerobic microbial degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum*/ G.A. Bonartseva, V.L. Myshkina, D.A. Nikolaeva et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2003. – T.109. – №.1-3. – P. 285-301.
- 17.** Qu X.H. In vivo studies of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions/ X.H. Qu, Q. Wu, K.Y. Zhang, G.Q. Chen // *Biomaterials*. – 2006. – T. 27. – №. 19. – P. 3540-3548.
- 18.** Sadi, R. K. Photodegradation of poly (3-hydroxybutyrate)/ Sadi R.K., Fachine G.J.M., Demarquette N.R. // *Polym. Degrad. Stab.* – 2010. – T. 95. – №. 12. – P. 2318-2327.

- 19.** Dobry A. Phase separation in polymer solution/ Dobry A. Boyer-Kawenoki F.-J. // Polymer Sci. -1947.-v2.-P90-100
- 20.** Тертышная, Ю.В. Деструкция поли-3-гидроксibuтирата и смесей на его основе под действием ультрафиолета и воды/ Ю.В. Тертышная, Л.С. Шибряева //Высокомолекулярные соединения. – 2013. – Т. 55. – №. 3. – С. 363.-100.
- 21.** Artsisa, M.I. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate)/ M.I. Artsisa, A.P. Bonartsevbc, A.L. Iordanskii// Mol. Cryst. Liq. Cryst.. – 2010. – Т. 523. – №.1. – С. 21/[593]-49/[621].
- 22.** Жила, Н.О. Деградация пленок из полигидроксиалканоатов в солоноватоводном озере Ши́ра/ Н.О. Жила, С.В. Прудникова, Е.С. Задереев и др.// Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2012.- №5(2).- С. 210-215.
- 23.** Volova, T.G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria/ T.G. Volova, A.N. Boyandina, A.D. Vasiliev // Polym. Degrad. Stab. – 2010. – Т.95. – №.12. – С. 2350-2359.
- 24.** Woodruff, M. A. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century / M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher // Prog. Polym. Sci. – 2010. – Т. 35. – №. 10. – P. 1217-1256.
- 25.** Huang S. Biodegradable Polymers. In: Mark F, Bikales N, Overberger C, Menges G, Kroshwitz J, editors. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. - New York: John Wiley and Sons.- 1985. p. 220-43.
- 26.** Coulembier O. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(beta-malic acid) derivatives / O. Coulembier, P. Degee, J.L. Hedrick, P. Dubois // Prog. Polym. Sci.-2006.-Т. 31.-P.723-747.
- 27.** Chandra R. Biodegradable polymers/ Chandra R., Rustgi R. // Prog. Polym. Sci. - 1998.-Т.23.-P.1273-1335.
- 28.** Okada M. Chemical syntheses of biodegradable polymers / Masahiko Okada // Prog. Polym. Sci. - 2002. - Т.27. - P.87-133.
- 29.** Nair, LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials / Nair L.S., Laurencin C.T. // Prog. Polym. Sci.-2007.-Т.32.-P.762-798.

- 30.** Vert M. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters / Vert M., Li S.M., Spenlehauer G., Guerin P. // *J. Mater. Sci. - Mater. Med.*- 1992.-T.3.-P.432-446.
- 31.** Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts / Michel Vert // *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* -2009.- T.20.-P.437-446.
- 32.** Ginde, R.M. In vitro chemical degradation of poly (glycolic acid) pellets and fibers / Ginde R. M., Gupta R. K. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1987. – T. 33. – №. 7. – C. 2411-2429.
- 33.** Göpferich A. Predicting drug release from cylindric polyanhydride matrix discs / Göpferich A., Karydas D., Langer R. // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.* – 1995. – T. 41. – №. 2. – P. 81-87.
- 34.** Bergsma J. E. Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws / J.E. Bergsma, W.C. de Bruijn, F.R. Rozema // *Biomaterials.* – 1995. – T. 16. – №. 1. – P. 25-31.
- 35.** Bostman O. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers / O. Bostman, E. Hirvensalo, J. Makinen // *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume.* – 1990. – T. 72. – №. 4. – P. 592-596.
- 36.** Holland, S.J. Biodegradable polymers / Holland S.J., Tighe B.J. // *Advances in Pharmaceutical Sciences.* – 1992. – T. 6. – P. 101-164.
- 37.** Middleton J.C. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / John C. Middleton, Arthur J. Tipton // *Biomaterials.* – 2000. – T. 21. – №. 23. – P. 2335-2346.
- 38.** Gunatillake P. A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / Pathiraja A.Gunatillake, Raju Adhikari // *Eur. Cell Mater.* – 2003. – T. 5. – №. 1. – P. 1-16.
- 39.** Pitt, C.G. Poly-s-caprolactone and its copolymers. In: Chasin, M, Langer, R eds. (1990) *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* Marcel Dekker Inc., New York, pp. 71-120
- 40.** Lam C.X.F. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo / Christopher X. F. Lam, Dietmar W. Hutmacher, Jan-Thorsten Schantz // *J. Biomed. Mater. Res. part A.* – 2009. – T. 90. – №. 3. – P. 906-919.

- 41.** Pitt C.G. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in vivo / C.G. Pitt, F.I. Chasalow, Y.M. Hibionada et al. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1981. – T. 26. – №. 11. – C. 3779-3787.
- 42.** Sun H. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant / Sun H., Mei L., Song C. et al. // *Biomaterials.* – 2006.- №27.-P.1735-1740.
- 43.** Woodward S.C. The intercellular degradation of poly- $\epsilon$ -caprolactone / Woodward S.C., Brewer P.S., Moatamed F. et al // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1985.- №19.- P.437-444.
- 44.** Chen D.R. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation / Chen D.R., Bei J.Z., Wang S.G. // *Polym. Degrad. Stab.* – 2000.-№67.- P.455-459.
- 45.** Persenaire O. Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone) / Persenaire O., Alexandre M., Degee P. // *Biomacromolecules.* – 2001.-№2.- P.288-294.
- 46.** Sivalingam G. Thermal degradation of poly (epsilon-caprolactone) / Sivalingam G., Madras G. // *Polym. Degrad. Stab.* – 2003.- №80.- P.11-16.
- 47.** Sivalingam G. Enzymatic and thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide), and their blends / Sivalingam G., Vijayalakshmi S.P., Madras G. // *Ind. Eng. Chem. Res.*- 2004.-№43.- P.7702-7709.
- 48.** Pitt C.G. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly ( $\epsilon$ -caprolactone), and their copolymers in vivo / G.G. Pitt, M.M. Gratzl, G.L. Kimmel // *Biomaterials.*- 1981.- №2.- P.215-220.
- 49.** Pulkkinen M. In vivo implantation of 2,2'-bis(oxazoline)-linked poly-epsilon-caprolactone: Proof for enzyme sensitive surface erosion and biocompatibility / Mika Pulkkinen, Minna Malin, Jan Böhm et al. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*- 2009.-V.36, I.2–3.- P.310-319
- 50.** Pego A. In vivo behaviour of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D.L-lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and time response / Pego A., Van Luyn M., Brouwer L. et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2003.- №67.- P.1044-1054.

- 51.** Pieja A.J. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria / Pieja A.J., Rostkowski K.H., Criddle C.S. // *Microbial Ecology*.- 2011.- V. 62.-№3.- P. 564-573.
- 52.** Tribelli P.M. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions / Tribelli P.M., López N.I. // *Extremophiles*. – 2011. – T. 15. – №. 5. – P. 541-547.
- 53.** Suriyamongkol P. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review / Pornpa Suriyamongkol, Randall Weselake, Suresh Narine et al. // *Biotechnol. Adv.* – 2007. – T. 25. – №. 2. – P. 148-175.
- 54.** Koller M. Sustainable Embedding of the Bioplastic Poly-(3-Hydroxybutyrate) into the Sugarcane Industry: Principles of a Future-Oriented Technology in Brazil / Koller M., Hesse P., Kutschera C., Bona R., et al. // *Polymers-Opportunities and Risks II*. – Springer Berlin Heidelberg.-2010. – P. 81-96.
- 55.** Akaraonye E. Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source / Akaraonye E., Moreno C., Knowles J. C. et al. // *Biotechnology journal*. – 2012. – T.7. – №.2. – P.293-303.
- 56.** Pandiana S.R.K. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3 / Pandiana S.R.K., Deepaka V., Kalishwaralala K. et al. // *Bioresour. Technol.* – 2010. – T. 101. – №. 2. – P. 705-711.
- 57.** Daneshi A. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity / Daneshi A., Dr Younesi H., Ghasempouri S. M. et al. // *Journal of chemical technology and biotechnology*. – 2010. – T. 85. – №. 11. – P. 1528-1539.
- 58.** Nga K.S. Evaluation of jatropha oil to produce poly (3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16 / Nga K.S., Ooia W.Y., Goha L.K. et al. // *Polym. Degrad. Stab.* – 2010. – T. 95. – №. 8. – P. 1365-1369.

- 59.** Ashby R.D. Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) biopolymers / Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., Strahan G.D. // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2011. – T. 88. – №. 7. – P. 949-959.
- 60.** Sindhu R. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers / Raveendran Sindhu, Balakrishnan Ammu, Parameswaran Binod et al. // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2011. – T. 54. – №. 4. – P. 783-794.
- 61.** Kawata Y. Poly (3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas sp.* KM-1 using waste glycerol / Kawata Y., Aiba S. // Biosci., Biotechnol., Biochem. – 2010. – T. 74. – №. 1. – P. 175-177.
- 62.** Zhu C. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759/ Zhu C., Nomura C.T., Perrotta J.A. et al. // Biotechnol. Progr. – 2010. – T. 26. – №. 2. – P. 424-430.
- 63.** Posada J.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol / Posada J.A., Naranjo J.M., López J.A. et al. // Process Biochem. – 2011. – T. 46. – №. 1. – P. 310-317.
- 64.** Смирнова Т.Н. Биодизель – альтернативное топливо для дизелей / Смирнова Т.Н., Подгаецкий В.М. // Двигатель. – 2007. – №.1. – С. 32-36.
- 65.** Taran M. Utilization of petrochemical wastewater for the production of poly (3-hydroxybutyrate) by *Haloarcula sp.* IRU1 / Taran M. // J. Hazard. Mater. – 2011. – T.188. – №.1. – P. 26-28.
- 66.** Yang Y.H. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha* / Yang Y.H., Brigham C.J., Budde C.F. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – T.87. – №.6. – P. 2037-2045.
- 67.** Obruca S. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16 / Obruca S., Marova I., Stankova M. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – T. 26. – №.7. – P. 1261-1267.



- 68.** Obruca S. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator* / Obruca S., Marova I., Svoboda Z. et al. // *Folia microbiologica*. – 2010. – T.55. – №.1. – P.17-22.
- 69.** Almeida A. Effects of aeration on the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli* / Almeida A., Giordano A.M., Nikel P.I. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – T.76. – №.6. – P.2036-2040.
- 70.** Taran M. Strategies of poly (3-hydroxybutyrate) synthesis by *Haloarcula sp.* IRU1 utilizing glucose as carbon source: Optimization of culture conditions by Taguchi methodology / Taran M., Amirkhani H. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2010. – T.47. – №.5. – P.632-634.
- 71.** Hiroe A. Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli* / Ayaka Hiroe, Kenji Tsuge, Christopher T. Nomura et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – T.78. – №.9. – P. 3177-3184.
- 72.** Arifin Y. Deletion of cscR in *Escherichia coli* W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture / Arifin Y., Sabri S., Sugiarto H. et al. // *J. Biotechnol.* – 2011. – T.156. – №.4. – P. 275-278.
- 73.** García-Hidalgo J. Extracellular production of *Streptomyces exfoliatus* poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Rhodococcus sp.* T104: determination of optimal biocatalyst conditions / García-Hidalgo J., Hormigo D., Priet M.A. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – T.93. – №.5. – P. 1975-1988.
- 74.** Tribelli P. M. Oxygen-sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*/ Tribelli P.M., Mendez B.S., Lopez N.I. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – T.19. – №.4. – P. 180-188.
- 75.** Chaogang W. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in the transgenic green alga *Chlamydomonas Reinhardt III*/ Chaogang W., Zhangli H., Anping L. et al. // *Journal of Phycology*. – 2010. – T.46. – №.2. – P. 396-402.
- 76.** Hempel F. Microalgae as bioreactors for bioplastic production / Hempel F., Bozarth A.S., Lindenkamp N. et al. // *Microb Cell Fact.* – 2011. – T.10. – P. 81.

- 77.** Chen G.Q. Industrial production of PHA / Chen G.Q. // *Plastics from Bacteria*. – Springer Berlin Heidelberg.- 2010. – P. 121-132.
- 78.** Pradella J.G.C. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor / Pradella J.G.C., Taciro M.K., Mateus A.Y.P. // *Bioresour. Technol.* – 2010. – T.101. – №.21. – P. 8355-8360.
- 79.** Tan D. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01 / Tan D., Xue Y.S., Aibaidula G. et al. // *Bioresour. Technol.* – 2011. – T.102. – №.17. – P. 8130-8136.
- 80.** Atlić A. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade / Atlić A., Koller M., Scherzer D. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – T.91. – №.2. – P. 295-304.
- 81.** Labet M. Synthesis of polycaprolactone: a review / Labet M., Thielemans W. // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – T.38. – №.12. – P. 3484-3504.
- 82.** Van Natta F.J. Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers / Van Natta F.J., Hill J.W., Carruthers W.H. // *J. Am. Chem. Soc.* -1934.-№56.-P.455-459.
- 83.** J. O. Iroh, in *Polymer Data Handbook*, ed. J. E. Mark, Oxford University Press, New York.- 1999.- pp. 361–362.
- 84.** Birmingham polymers, Chemical & Physical properties. - Режим доступа: <http://www.birminghampolymers.com/>.
- 85.** Ikada Y. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications / Ikada Y., Tsuji H. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2000. – T.21. – №.3. – P. 117-132.
- 86.** Липатова Т.Э., Пхакадзе Г.А. Применение полимеров в хирургии. Киев: Наук. Думка. -1977.-132с.
- 87.** Штильман, М.И. Полимеры медико-биологического назначения / Штильман М.И. - М.:ИКЦ «Академкнига»,2006. - 426с.
- 88.** Волова Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: Электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). Красноярск: ИПК СФУ. -2009.

- 89.** Марычев С.Н. Полимеры в медицине: учебное пособие / С.Н. Марычев, Б.А. Калинин. - Владимир: Владим. гос. ун-т., 2001. -68с.
- 90.** Севастьянов, В.И. Новое поколение материалов медицинского назначения / Севастьянов В. И. // Перспективные материалы. – 1997. – Т.4. – С. 56-60.
- 91.** Chaturvedi K. Blend microspheres of poly (3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate phthalate for colon delivery of 5-fluorouracil / Kiran Chaturvedi, Anandrao R. Kulkarni and Tejraj M. Aminabhavi // Ind. Eng. Chem. Res. – 2011. – Т.50. – №.18. – P. 10414-10423.
- 92.** Мосопов, С.Н. Конста (рисперидон-микросферы)- первый атипичный антипсихотик пролонгированного действия / С.Н. Мосопов, М.В. Кузовкова // Психиатрия и психофармакотерапия . -2004.-Т6.-№5 – С. 228-232.
- 93.** Лившиц, В.А. Микросферы из полигидроксibuтирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ / В.А. Лившиц, А.П. Бонарцев, А.Л. Иорданский и др. // Высокомолекулярные соединения, Серия А.- 2009.- Т.51.- №7.- С. 1–9
- 94.** Косенко, Р.Ю. Контролируемое высвобождение антисептика из мембран на основе поли(3-гидроксibuтирата): сочетание диффузного и кинетического механизмов / Р.Ю. Косенко, А.Л. Иорданский, В.С. Маркин и др. // Химико-фармацевтический журнал.- 2007.- Т.41.- №12.- С. 1-9.
- 95.** Иванцова, Е.Л. Структура и пролонгированный транспорт в системе биodeградируемый поли(3-гидроксibuтират)-лекарственное вещество / Е.Л. Иванцова, Р.Ю. Косенко, А.Л. Иорданский и др. // Высокомолекулярные соединения. – 2012. – Т.54. – №.2. –С.215.
- 96.** Бычук, М.А. Пленочные материалы из смеси биodeградируемых полиэфиров с антимикробной и протеолитической активностью / М.А. Бычук, Н.Р. Кильдеева, Т.А. Чердынцева // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т.48. – №.1. – С. 45-49.
- 97.** Zhanga X. Preparation and characterization of biomimetic adsorbent from poly-3-hydroxybutyrate / Zhanga X., Weia C., Hea Q. et al. // Journal of Environmental Sciences. – 2010. – Т.22. – №.8. – P. 1267-1272.

- 98.** Еке Г. Проникновение частиц из поли(3-гидроксибутирата/3-гидроксивалерата) в кожу / Г. Еке, А.М. Кузьмина, А.В. Муруева и др. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2012.- №5.- С. 404-416.
- 99.** Foroughi M.R. Physical and mechanical properties of a poly-3-hydroxybutyrate-coated nanocrystalline hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering / Mohammad Reza Foroughi, Saeed Karbasi, Reza Ebrahimi-Kahrizsangi // J. Porous Mater. – 2012. – Т.19. – №.5. – P. 667-675.
- 100.** Nemati Hayati A. Characterization of poly (3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications / Amir Nemati Hayati, S.M. Hosseinalipour, H.R. Rezaie et al. // Mater. Sci. Eng., C. – 2012. – Т. 32. – №.3. – P. 416-422.
- 101.** Nemati Hayati A. Preparation of poly (3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering / Nemati Hayati A., Rezaie H.R., Hosseinalipour S.M. // Mater. Lett. – 2011. – Т.65. – №.4. – P. 736-739.
- 102.** Rai R. The homopolymer poly (3-hydroxyoctanoate) as a matrix material for soft tissue engineering / Rai R., Boccaccini A.R, Knowles J.C. // J. Appl. Polym. Sci. – 2011. – Т.122. – №.6. – P. 3606-3617.
- 103.** Шишацкая, Е.И. Биотехнология полигидроксиалканоатов: научные основы медико-биологического применения: дис. ... докт. биол. наук: 03.00. 23 / Екатерина Игоревна Шишацкая. – Красноярск, 2009. – 259с.
- 104.** Misra S.K. Poly (3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications / Misra S.K., Ansari T.I., Valappil S.P. et al. //Biomaterials. – 2010. – Т.31. – №.10. – P. 2806-2815.
- 105.** Foroughi M.R. Physical and mechanical properties of a poly-3-hydroxybutyrate-coated nanocrystalline hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering / Foroughi M. R., Karbasi S., Ebrahimi-Kahrizsangi R. // J. Porous Mater. – 2012. – Т.19. – №.5. – P. 667-675.
- 106.** Xu X.Y. The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds / Xu X.Y., Li X.T., Peng S.W. et al. // Biomaterials. – 2010. – Т.31. – №.14. – P. 3967-3975.

- 107.** Сергеев, В.П. Развитие методов изготовления модифицированных нитей, соответствующих современным требованиям в медицине. Обзор / В.П. Сергеев, Е.П. Плугань, Е.А. Иванченко и др. // Химические волокна.- 2002.- № 6.- С. 49–55.
- 108.** Шкуренко, С.И. Биологически активные хирургические нити «никант» / С.И. Шкуренко, Т.С. Идиатулина // Химические волокна. – 2002.- №5.- С.32–34.
- 109.** Федоров, М.Б. Антимикробная активность хирургических нитей, модифицированных поли-3-гидроксипропионатом, со структурой ядро-оболочка / М.Б. Федоров, Г.А. Вихорева, Н.Р. Кильдеева и др. // Прикладная биохимия и микробиология.- 2007.- Т.43.- №6.- С.685-690.
- 110.** Федоров, М.Б. Моделирование процесса поверхностного модифицирования шовных нитей / М.Б. Федоров, Г.А. Вихорева, Н.Р. Кильдеева и др. // Химические волокна.- 2005.- Т.37.- №6.- С.441-446.
- 111.** Merkli A. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs / Merkli A., Tabatabay C., Gurny R. // Prog. Polym. Sci. -1998.- №23.- P.563-580.
- 112.** Freiberg S. Polymer microspheres for controlled drug release / Freiberg S., Zhu X.X. // Int. J. Pharm. – 2004.- Т.282. – №1.- P.1-18.
- 113.** Sinha V.R. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview / Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R. et al. // Int. J. Pharm. -2004.- Т.278.- №1. –P.1-23.
- 114.** Kiminta D.M.O. Colloidal dispersions, nanogels / Kiminta D.M.O., Braithwaite G., Luckham P.F. // Polymer Materials Encyclopedia. CRC Press, Boca Raton. – 1996. – С. 1298-1309.
- 115.** Piirma I. Colloids. In: Mark H.F., Bikales N.M., Overberger C.G., et al. editors. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd ed. - New York: John Wiley and Sons.- 1985.- P. 125-130.
- 116.** Grignard B. Synthesis of Biodegradable Poly-epsilon-caprolactone Microspheres by Dispersion Ring-Opening Polymerization in Supercritical Carbon Dioxide / Grignard B., Stassin F., Calberg C. // Biomacromolecules. – 2008. – Т.9.- №11.- P. 3141-3149.

- 117.** Kwon S. Synthesis of biocompatible and biodegradable polymer particles in supercritical carbon dioxide / Kwon S., Lee K., Kim H. et al. // *Colloid. Polym. Sci.* - 2008. – T.286. - №10. – P. 1181-1191.
- 118.** Vasir J.K. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system / Vasir J.K., Tambwekar K., Garg S. // *Int. J. Pharm.* -2003. – T.255. - №1.- P.13-32.
- 119.** Bai X.L. Effect of polymer compositions on the fabrication of poly(ortho-ester) microspheres for controlled release of protein / Bai X.L., Yang Y.Y., Chung T.S. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2001.- T.80.- №10.- P. 1630-1642.
- 120.** Zhang S. Nanoparticulate Systems for Growth Factor Delivery / Zhang S., Uludag H. // *Pharm. Res.*- 2009.- T.26.- №7.- P.1561-1580.
- 121.** Ng K.W. In vivo evaluation of an ultra-thin polycaprolactone film as a wound dressing / Ng K.W., Achuth H.N., Moochhala S. et al. // *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* – 2007.- T.18.- №7.-P. 925-938.
- 122.** Medlicott N.J. Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly( $\epsilon$ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation / Medlicott N.J., Jones D.S., Tucker I.G. et al. // *Int. J. Pharm.* – 1992.- T.84.- №1. – P.85-89.
- 123.** Jones D.S. Poly(epsilon-caprolactone) and poly(epsilon-caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro / Jones D.S., Djokic J., McCoy C.P. et al. // *Biomaterials.* – 2002.-T. 23.- №23.- P. 4449-4458.
- 124.** Dhanaraju M.D. Characterization of polymeric poly(epsilon-caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids / Dhanaraju M.D., Gopinath D., Ahmed M.R. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2006.- T.76.- №1.- P.63-72.
- 125.** Dhanaraju M.D. Influence of manufacturing parameters on development of contraceptive steroid loaded injectable microspheres / Dhanaraju M.D., Jayakumar R., Vamsadhara C. // *Chem. Pharm. Bull.* 2004.- T.52.- №8.- P.976-979.

- 126.** Dhanaraju M.D. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones / Dhanaraju M.D., Vema K., Jayakumar R. et al. // *Int. J. Pharm.* 2003.- T.268.- №1.- P.23-29.
- 127.** Lowry K.J. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model / Lowry K.J., Hamson K.R., Bear L. et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1997.-T.36.- №4.- P.536-541.
- 128.** Su A.P. Fabrication of biomimetic PCL scaffold using rapid prototyping for bone tissue engineering / Su A.P., Jung B.L., Yang E.K et al. // *Macromolecular Research.*- 2014.- T. 22.- №8.- P.882-887
- 129.** Chern M.J. 3D scaffold with PCL combined biomedical ceramic materials for bone tissue regeneration / M.J. Chern, L.Y. Yang, Y.K. Shen et al. // *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing.*- 2013.- T. 14.- № 12.- P.2201-2207.
- 130.** Shalumon K.T. Preparation, Characterization and Cell Attachment Studies of Electrospun Multi-scale Poly(caprolactone) Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering / K.T. Shalumon, N.S. Binulal, M. Deepthy et al. // *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry.*- 2010.- T.48.- №1.- P. 21-30.
- 131.** Coi W.Y. Synthesis of poly( $\epsilon$ - caprolactone) /hydroxyapatite nanocomposites using in-situ co-precipitation / W.Y. Coi, H.E. Kim, S.Y. Oh et al. // *Mater. Sci. Eng., C.* - 2010 – T.30.- №5.- P. 777-780.
- 132.** Ayako Oyane. Simple surface modification of poly( $\epsilon$ -caprolactone) to induce its apatite-forming ability / Ayako Oyane, Masaki Uchida, Yoshiro Yokoyama et al. // *J. Biomed. Mater. Res., A.* – 2005.- T.75a.- № 1.- P. 138–145.
- 133.** Alani A. Ion release characteristics, precipitate formation and sealing ability of a phosphate glass- polycaprolactone-based composite for use as a root canal obturation material / Alani A., Knowles J.C., Chrzanowski W. et al. // *Dent. Mater.*– 2009. – T. 25. – №. 3. – P. 400-410.
- 134.** Shor L. Precision extruding deposition of composite polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering / L. Shor, A. Darling, B. Starly et

- al. // Bioengineering Conference, 2005. Proceedings of the IEEE 31st Annual Northeast. – IEEE, 2005. – P. 172-173.
- 135.** Silva G.A. Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts / Silva G.A., Ducheyne P., Reis R.L. // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – T. 1. – №. 1. – P. 4-24.
- 136.** Agrawal C. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering / Agrawal C., Ray R.B. // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – T. 55. – №. 2. – P. 141-150.
- 137.** Martina M. Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review / Martina M., Hutmacher D.W. // Polym. Int. – 2007. – T. 56. – №. 2. – P. 145-157.
- 138.** Szot C.S. Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds / C.S. Szot, C.F. Buchanan, P. Gatenholm et al. // Mater. Sci. Eng. C. – 2011. – T. 31. – №. 1. – P. 37-42.
- 139.** Santos M.I. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization / M.I. Santos, R.E. Unger, R.A. Sousa et al. // Biomaterials. – 2009. – T. 30. – №. 26. – P. 4407-4415.
- 140.** Dash T.K. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review / Dash T.K., Konkimalla V.B. // J. Controlled Release. – 2012. – T. 158. – №. 1. – P. 15-33.
- 141.** Zhu B. Engineering calcium deposits on polycaprolactone scaffolds for intravascular applications using primary human osteoblasts / B. Zhu, S.R. Bailey, C. Mauli Agrawal // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2011.- №5(4).- P. 324–336.
- 142.** Yu H. Biocompatibility of Poly-epsilon–caprolactone-hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells / H. Yu, P.H. Wooley, S.Y. Yang // J. Orthop. Surg. Res. - 2009.- №4.- P.5.
- 143.** Singh S. The enhancement of VEGF-mediated angiogenesis by polycaprolactone scaffolds with surface cross-linked heparin / Singh S., Wu B.M., Dunn J.C.Y. // Biomaterials. – 2011. – T. 32. – №. 8. – P. 2059-2069.



- 144.** Holy C.E. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period / C.E. Holy, M.S. Shoichet, J.E. Davies // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2000. – T. 51. – №. 3. – P. 376-382.
- 145.** Song H.H. A novel polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering / H.H. Song, M.K. Yoo, H.S. Moon et al. // *Key Eng. Mater.* – 2007. – T. 342. – P. 265-268..
- 146.** Andukuri A. A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants / A. Andukuri, M. Kushwaha, A. Tambralli et al. // *Acta Biomater.* – 2011. – T. 7. – №. 1. – P. 225-233.
- 147.** B.W. Tillman The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction / B.W. Tillman, S.K. Yazdani, S.J. Lee et al. // *Biomaterials.* – 2009. – T. 30. – №. 4. – P. 583-588.
- 148.** Nisbet D. R. Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain / Nisbet, A.E. Rodda, M.K. Horne et al. // *Biomaterials.* – 2009. – T. 30. – №. 27. – P. 4573-4580.
- 149.** Cao H. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering / Haoqing Cao, Ting Liu, Sing Yian Chew // *Adv. Drug Deliv.* – 2009. – T. 61. – №. 12. – P. 1055-1064
- 150.** Lowery J.L. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous mats / Lowery J.L., Datta N., Rutledge G.C. // *Biomaterials.* – 2010. – T. 31. – №. 3. – P. 491-504.
- 151.** Wutticharoenmongkol P. Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles / P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, P. // *Macromolecular bioscience.* – 2006. – T. 6. – №. 1. – P. 70-77.
- 152.** C. Erisken. Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications / C. Erisken, D.M. Kalyon, H. Wang // *Biomaterials.* – 2008. – №29. – P.4065– 4073.

- 153.** P. Wutticharoenmongkol. Novel bone scaffolds of electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles / P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant et al. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* -2006.- №6(2).-P.514– 522.
- 154.** C.E. Petrie Aronin. Osteogenic differentiation of dura mater stem cells cultured in vitro on three-dimensional porous scaffolds of poly(epsilon-caprolactone) fabricated via co-extrusion and gas foaming / C.E. Petrie Aronin, J.A. Cooper Jr., L.S. Sefcik et al. // *Acta Biomater.* – 2008.- №4(5).- P.1187– 1197.
- 155.** I. Gercek. A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying / Gercek, R.S. Tigli, M. Gumusderelioglu // *J. Biomed. Mater. Res. A.*- 2008.- №86(4).- P.1012–1022.
- 156.** N. Mohan. Polyvinyl alcohol-poly(caprolactone) semi IPN scaffold with implication for cartilage tissue engineering / N. Mohan, P.D. Nair // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2008.- №84(2).- P.584– 594.
- 157.** K.Y. Chang. Fabrication and characterization of poly(gamma-glutamic acid)-graft-chondroitin sulfate/polycaprolactone porous scaffolds for cartilage tissue engineering / K.Y. Chang, L.W. Cheng, G.H. Ho et al. // *Acta Biomater.* – 2009.- №5.- P.1937– 1947.
- 158.** E.Y. Teo. Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds / E.Y. Teo, S.Y. Ong, M.S. Chong et al. // *Biomaterials.*- 2011.- №32.- P.- 279–287.
- 159.** D. Yao. Fabrication of polycaprolactone scaffolds using a sacrificial compression-molding process / D. Yao, A. Smith, P. Nagarajan et al. // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2006.- №77.- P.287–295.
- 160.** S.A. Abbah. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery / S.A. Abbah, C.X. Lam, D.W. Huttmacher et al. // *Biomaterials.*- 2009.- №30.- P.5086– 5093.
- 161.** Чалых А.Е. Диаграммы фазового состояния полимерных систем / А.Е. Чалых. - М.: Янус-К, 1998.-216с.
- 162.** Чернышова, Ю.В. Полимерные системы на основе биосовместимых полиэфигов и производных сополи(акрил)метакрилатов для

микрокапсулирования биологически активных соединений. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Чернышова Юлия Валерьевна.- Москва, 2003.- 144с.

**163.** Бояндин, А.Н. Получение и исследование полимерных смесей на основе поли-3-гидроксибутирата / А.Н. Бояндин, Е.Д. Николаева, А.В. Шабанов и др. // Журнал сибирского федерального университета. Биология, ч. 2. – 2014.- №7.- с.174-185.

**164.** Furukawa T. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly (hydroxybutyrate)/poly (L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry / Furukawa T., Sato H., Murakami R. et al. // Macromol. – 2005. – Т. 38. – №.15. – P. 6445-6454.

**165.** Кильдеева Н.Р. Получение высокопористых пленок из смешанных растворов полигидроксибутирата и поликапролактона / Кильдеева Н.Р., Гальбрайт Л.С., Вихорева Г.А., Бычук М.А. и др.// Сб. статей «Структура и динамика молекулярных систем» Йошкар-Ола–Уфа–Казань–Москва. – 2005. – №.12. – С. 342-345.

**166.** Пол Д. Полимерные смеси. т 2 / Пол Д., Ньюмен С. - М.:Мир.-1981.-564с.

**167.** Silva R. Miscibility influence in the thermal stability and kinetic parameters of poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene terephthalate) sulphonated blends / Silva R., Carvalho G.M., Muniz E.C. et al. // Polímeros. – 2010. – Т.20. – №.2. – P.153-158.

**168.** Savenkova L. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films / Savenkova L., Gercberga Z., Nikolaeva V. et al. // Process Biochem. – 2000. – Т.35. – №.6. – P. 573-579.

**169.** Кильдеева Н.Р. Получение биodeградируемых пористых пленок для использования в качестве раневых покрытий / Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42. – №.6. – С.716-720.

**170.** Hujanen-Vainio, M. Impact Modification of Lactic Acid based Poly(ester-urethanes) by Blending / Hujanen-Vainio, M.; Kylma, J.; Hiltunen, K. et al. // J. Appl. Polym. Sci. – 1997.- №63.- P.1335-1343.

- 171.** Wolf, O. (Ed). Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. Seville: Institute for Prospective Technological Studies: Technical Report Series, 2005. – p.256
- 172.** Avella, M. Review: Properties of Blends and Composites Based on Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and Poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) Copolymers / Avella M., Martuscelli E., Raimo M. // J. Mater. Sci.- 2000.- №35.- P.523-545.
- 173.** Pat. 7297394. Biodegradable Films and Sheets Suitable for Use as Coatings, Wraps, and Packaging Materials / Khemani, K.; Schmidt, H.; Hodson, S.K. // U.S.- 2007.
- 174.** Noda, I. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid) / Noda I., Satkowski M.M., Dowrey A.E. et al. // Macromolecular Bioscience.- 2004.- №4.- P. 269-275.
- 175.** Duarte, M.A. Thermal and Mechanical Behavior of Injection Molded Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(- caprolactone) Blends / M.A. Duarte, R.G. Hugen, E.S. Martins et al. // Materials Research.- 2006.- №9.- P.25-27.
- 176.** Terada S., Takagi J. Biodegradable film and process for producing the same: пат. 6326440 CIIIA. – 2001.
- 177.** Kim, J. Miscibility and Rheological Characteristics of Biodegradable Aliphatic Polyester and Linear Low Density Polyethylene Blends / J. Kim, J.H. Kim, T.K. Shin et al. // Eur. Polym. J.- 2001.- №37.- P.2131-2139.
- 178.** Eickhoff J., Harrison G. M. GPEC 2006 Paper Abstract № 2B Title: The Rheology and Degradation of Renewable Resource Polymers.
- 179.** Schreck, K.M. Block Copolymers and Melt Blends of Polylactide with Nodax™ Microbial Polyesters: Preparation and Mechanical Properties / Schreck, K.M., Hillmyer M.A. // J. Biotechnol. – 2007.- №132. – P.287-295.
- 180.** Ferreira, B.M.P. Films of Poly(L-lacticacid)/Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends: In vitro Degradation / B.M.P. Ferreira, C.A.C. Zavaglia, E.A.R. Duek // Materials Research.- 2001.- №4.- P.34-42.

- 181.** Iannace, S. Poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)/Poly-L-lactide Blends: Thermal and Mechanical Properties / S. Iannace, L. Ambrosio, S.J. Huang et al. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1994.- №54.- P.1525-1536.
- 182.** Yu, L. Polymer Blends and Composites from Renewable Resources / L. Yu, K. Dean, L. Li // *Prog. Polym. Sci.* – 2006.- №31.- P. 576-602.
- 183.** Blumm, E. Miscibility, Crystallization and Melting of Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(L-lactide) Blends / E. Blumm, A.J. Owen // *Polymer.*- 1995.- №36.- P. 4077-4081.
- 184.** Zhang, L. Miscibility, Crystallization and Morphology of Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(D,L-lactide) Blends / L. Zhang, C. Xiong, X. Deng // *Polymer.*- 1996.- №37.- P. 235- 241.
- 185.** Freier T. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate) / Freier T., Kunze C., Nischan C. // *Biomaterials.*- 2002.- № 23(13).- P. 2649-2657.
- 186.** Kunze C. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material / Kunze C., Edgar Bernd H., Androsch R. et al. // *Biomaterials.*- 2006.- T.27.- №2.- P. 192-201.
- 187.** Kikkawa Y. Effect of Phase Structure on Enzymatic Degradation in Poly(l-lactide)/Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) Blends with Different Miscibility / Kikkawa Y., Suzuki T., Kanosato M. et al. // *Biomacromolecules.*- 2009.- T.10.- №4.- P.1013-1018.
- 188.** Vogel C. FT-IR Imaging Spectroscopy of Phase Separation in Blends of Poly(3-hydroxybutyrate) with Poly(l-lactic acid) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) / Christian Vogel, Elke Wessel, Heinz W. Siesler // *Biomacromolecules.*- 2008.- T.9.- №2.- P. 523-527.
- 189.** Park J.W. Uniaxial Drawing and Mechanical Properties of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/Poly(l-lactic acid) Blends / Jun Wuk Park, Yoshiharu Doi, Tadahisa Iwata // *Biomacromolecules.*- 2004.- T.5.- №4.- P.1557-1566.
- 190.** Iordanskii A.L., Ol'khov A.A., Pankova et al. in: *Fillers, Filled Polymers and Polymer Blends*, Wiley-VCH, New-York.-2006.-P.108-116.
- 191.** A.L.Iordanskii. Impact of Morphology upon Physical Properties in Environmentally Friendly Blends of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate). Chapter 1 in

Book “Polymer analysis, degradation and Stabilization.” / A.L. Iordanskii, Y.N. Pankova, V.V. Yakovlev et al. - New York.: Nova Science Publishers, 2005.- P. 1 – 14.

**192.** Маркин В.С. Транспорт воды в полимерных смесях поли(3-гидроксибутирата) / В.С. Маркин, Ю.Н. Панкова, В.А.Шершнев и др. // Каучук и Резина.- 2006.- №6.- С. 8 -15.

**193.** Иорданский, А.Л. Транспорт воды как структурно-чувствительный процесс, характеризующий морфологию биodeградебельных полимерных систем. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Т.1: Химическая кинетика: Сб.обзорных статей / А.Л. Иорданский, Ю.Н. Панкова, Р.Ю. Косенко и др.- М.: Химия, 2005. - С. 640-657.

**194.** Бонарцев, А.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе / Бонарцев, А. П., Бонарцева, Г. А., Шайтан, К. В. и др. // Биомедицинская химия.- 2011.- Т.57.- №4.- С. 374-391.

**195.** Пол Д. Полимерные смеси. т 1 / Пол Д., Ньюмен С. - М.:Мир.-1981.-550с.

**196.** Flory P.J. Principles of polymer chemistry / Paul J. Flory - New-York: Cornell Univ Press. - 1953.- 594p.

**197.** Севастьянов, В.И. Медико-биологические свойства полиоксиалканоатов – биodeградируемых бактериальных полимеров / В.И. Севастьянов, Н.В. Перова, И.А. Довжик и др. // Перспективные материалы.-2001.-№5.-с.46-55.

**198.** Кильдеева, Н.Р. Особенности формирования структуры пленок из смешанных растворов биосовместимых полиэфиров / Н.Р. Кильдеева, Л.В. Владимиров, А.В. Миронов и др. // Структура и динамика молекулярных систем.- 2008.-№3.-ч.А.-с.111-117.

**199.** Coleman M.M. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system / M. M. Coleman and J. Zarian // J.Polym.Sci., part B: Polym.Phys.- 1979. - v.17 – p. 837-850.

**200.** Jieping L. Crystallization kinetical and morphological and morphological peculiarities in binary crystalline/crystalline blends / Jieping L., Jungnickel B.-J // J.Polym.Sci., part B: Polym.Phys. – 2007.- v.45.- p.1917-1931.

- 201.** Бычук, М.А. Особенности формирования структуры пленок из смешанных растворов биodeградируемых полиэфиров / М.А. Бычук, Л.В.Владимиров, Н.Р.Кильдеева// Пластические массы.- 2015.- №1-2. – с.18-21.
- 202.** Ефремов, Г.И. Макрокинетика процессов переноса / Г.И. Ефремов.- М.: МГТУ им. А.Н.Косыгина. – 2001. - 289с.
- 203.** Волков, А.В.Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А.В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2005. - № 2. - С. 43-45.
- 204.** Кильдеева, Н.Р. Получение высокопористых пленок из смешанных растворов полигидроксibuтирата и поликапролактона / Н.Р.Кильдеева, Л.С. Гальбрайх, Г.А. Вихорева, М.А. Бычук, А.Л. Иорданский // Сборник статей «Структура и динамика молекулярных систем».- 2005.- 12.- с.342-345.
- 205.** Староверова, О.В. Ультратонкие волокна на основе биополимера полигидроксibuтирата, модифицированные наноразмерными модификациями диоксида титана / О.В. Староверова, А.А.Ольхов, Г.М.Кузьмичева // Вестник МИТХТ. - 2011. - Т.6. - №6. - С. 120-127.
- 206.** Степаненко Б.Н. Органическая химия / Б.Н. Степаненко.- М.:Медгиз.- 1957.- 415с.
- 207.** Boudriot U. Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering—A Brief Overview / Boudriot U., Dersch R., Greiner A., et al. // Artificial Organs. 2006. – V.30. – P. 785–792.
- 208.** Кильдеева, Н.Р. Структурoобразование в формовочных растворах ив присутствии жидкой дисперсной фазы / Н.Р. Кильдеева, Л.С. Гальбрайх // Химические волокна. -2000. - №6. - С.24-27.
- 209.** Ефименко, Н.А. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении / Н.А. Ефименко, М.В. Лысенко, Ю.И. Стернин и др. // Русский медицинский журнал. – 2011. - №5. - с.368-372.
- 210.** Ефименко, Н.А. Системная энзимотерапия в гнойной хирургии / Н.А. Ефименко, А.А. Новожилов, Г.Ю. Кнорринг // Амбулаторная хирургия. – 2005. – №3. – С. 51–55.

- 211.** Kildeyeva N.R., Gostishev V.K., Tolstikh P.I., Galbraich L.S. Development of the fibre with protease controlled release for obtained surgical suture materials.// In: Proc. 24th Intern. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials. Stochholm. 1997. P.603-604.
- 212.** Вирник, А.Д. Получение пленок и волокон, содержащих протеолитические ферменты, и применение их в хирургической практике / А.Д. Вирник, В.К. Гостищев, Н.Р. Кильдеева и др. // Прикл. биохим. микробиол. - 1987. -Т.23. - №1. -С.78-83.
- 213.** Никоноров, В.В. Закономерности структурообразования в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента для получения волокнистых биокатализаторов / В.В. Никоноров, П.А. Перминов, Н.Р. Кильдеева // Хим. волокна. – 2006. – №2. – С. 9-11.
- 214.** Государственная фармакопея СССР / под ред. Машковского и др. / XI изд., вып.2. – М., 1990, с.210-225.



# **ПРИЛОЖЕНИЯ**

Федеральное государственное учреждение  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ  
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ РОСЗДРАВНАДЗОРА  
ИЛ по токсикологическим испытаниям медицинских изделий

129301, Москва, ул.Касаткина, 3

Свидетельство  
РОСЗДРАВНАДЗОРА  
№ ФС 24-ПТИ-06  
от 27.03.2006

"УТВЕРЖДАЮ"  
Генеральный директор ФГУ ВНИИИМТ  
Руководитель испытательного центра  
В.М. Поонов  
2006 г.



ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ N 24-06 от 12.07.2006г.

Наименование изделия (материала):

**Раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата  
(опытные лабораторные образцы, разработанные МГТУ им. А.Н.Косыгина)**

Назначение изделия или материала: биодegradируемое покрытие на рану.

Вид контакта с организмом: Длительный контакт с раневой поверхностью

Причины исследования: опытные лабораторные образцы

Изделие (материал) представлено на испытания МГТУ им. А.Н.Косыгина

Испытания проведены на основании письма №03-54/146 от 4.05.2006г.

Испытания проведены в соответствии с документами:

Стандарты серии ГОСТ Р ИСО 10993 "Оценка биологического действия  
медицинских изделий:"

"Ч.1.Оценка и исследования"

"Ч.4.Исследование изделий, взаимодействующих с кровью."

"Ч.10.Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия."

"Ч.11.Исследование общетоксического действия."

"Ч.12.Приготовление проб и стандартных образцов."

ГОСТ 31214-2003 "Изделия медицинские. Требования к образцам и документация, представляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность."

"Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения", МЗ СССР, 1987.

ГН 2.3.3.972-00 "Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами".

1. Наименование применяемых материалов, НТД на них или рецептурный состав, способ стерилизации изделия:

Биодegradируемое покрытие представляет собой пленку, изготовленную из смеси полимеров и лекарственных веществ: полигидроксibuтират (ПГБ) ТУ 939-0001-02699441-00 - 48%; поликапролактон (ПКЛ) ММ 65 кДа, Aldrich - 48,6%; трипсин Serva, Германия - 1,5%; фуразолидон ВФ 42-323-98 - 2,5%. При изготовлении пленок используется хлороформ, х.ч. 781-2004, ТУ 2631-001-29483 "Химмед", РФ

и вода дистиллированная ГОСТ 6709-72. Опытные образцы упакованы в полиэтиленовые пакеты ГОСТ 10354 и простерилизованы радиационным облучением дозой 25 кГр (МРТИ РАН).

2. Краткое изложение результатов испытаний:

2.1. Результаты санитарно-химических испытаний:

Содержание в водных вытяжках из образцов восстановительных примесей, выраженное в объеме 0.02 н. раствора тиосульфата натрия, затраченного на их определение, составляет 0.32 мл (допустимое - 1.00 мл). Изменение pH вытяжки в сравнении с контролем составляет 0.03 (допустимое - +/-1.00). Миграция металлов в водную вытяжку, определяемая атомно-абсорбционным методом, не обнаружена при минимальной определяемой концентрации (в мг/л): кадмий - 0,0005; свинец - 0,01; медь - 0,02 (допустимое - 0,001; 0,03; 1,0).

2.2. Результаты токсикологических испытаний:

Изучение острой токсичности проводили в условиях внутрибрюшинного введения вытяжки из покрытия белым мышам. Исследование кожно-раздражающего и аллергенного действия проводили методом предварительной внутрикожной сенсибилизации, многократного подкожного введения вытяжки, провокационной внутрикожной пробы и реакции дегрануляции тучных клеток. На протяжении всего периода наблюдения не отмечено явлений интоксикации и гибели подопытных животных. На вскрытии животных макроскопически не выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей подопытных животных. Коэффициенты масс внутренних органов подопытных животных не имеют статистически достоверных отличий от аналогичных показателей контрольных животных. Общетокического, аллергенного и раздражающего действия вытяжки не обнаружено.

Вытяжки из образцов не проявили гемолитического действия в опытах "ин витро" с изолированными эритроцитами кроликов: гемолиз 0% при допустимом значении показателя менее 2%.


3. Выводы по результатам испытаний:

Раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата (опытные образцы) по токсикологическим и санитарно-химическим показателям отвечают требованиям, предъявляемым к медицинским покрытиям на раны.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата (опытные лабораторные образцы, разработанные МГТУ им. А.Н.Косыгина)**  
нетоксичны, отвечают требованиям нормативной документации.

Заведующий отделом токсикологических испытаний  
и исследований материалов и изделий медицинского  
назначения, руководитель ИЛ

 В.Г.Лаппо

Ответственные за испытания:

Ст.н.сотр.

Вед.н.сотр.


Н.А.Другова

С.Я.Ланина

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И  
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор  
ФГУ «ВНИИФМТ»



И. ЛЕОНОВ

2006 г.

АКТ  
АТНЛ 0.009.240.689

г. Москва

Проведение технических испытаний опытных лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксибутирата стерильных, представленных и разработанных Московским государственным текстильным университетом им. А.Н. Косыгина, (Факультет химической технологии и экологии), г. Москва.

АТНЛ 0.009.240.689

Составлен ФГУ «ВНИИИМТ»

Ведущий по испытаниям – зав. лаб. ФГУ «ВНИИИМТ» Стасевич Л.Н.  
Члены испытательной группы - инженер 1 кат. ФГУ «ВНИИИМТ»  
Борисова Н.А.

1. В период с 27.07.2006 г. по 14.08.2006 г. ФГУ «ВНИИИМТ» провел технические испытания лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксипропаната, содержащие трипсин и фуразолидон, представленных Московским государственным текстильным университетом им. А.Н.Косыгина, Факультет химической технологии и экологии, г.Москва. Технические испытания проводились на базе ФГУ «ВНИИИМТ».

2. Для проведения испытаний были представлены:

2.1 Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксипропаната в количестве трех штук.

2.2. Техническая документация:

-Токсикологическое заключение ФГУ «ВНИИИМТ»

-Протоколы предварительных испытаний:

- проверка паропроницаемости образцов ( Протокол лабораторных испытаний от 25 мая 2006 г. МГТУ им. Косыгина)

- проверка прочности образцов (Протокол лабораторных испытаний от 30 мая 2006 г. МГТУ им. Косыгина)

- проверка протеолитической активности образцов (Протокол лабораторных испытаний от 25 мая 2006 г. МГТУ им. Косыгина)

- проверка внешнего вида и размеров образцов (Протокол лабораторных испытаний от 20 мая 2006 г. МГТУ им. Косыгина)

- проверка антимикробной активности образцов пленок (Проверка лабораторных испытаний от 29 мая 2006 г.).

- протокол стерилизации (Протокол № Э1 от 14.06.2006 г. ФГУП Московский Радиотехнический институт РАН) .

3. Краткая техническая характеристика изделия.

Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксипропаната представляют собой пленку, изготовленную из смеси полимеров и лекарственных веществ.

Состав изделия:

-полигидроксипропанат (ПГБ) 48,6 %

-поликапролактон (ПКЛ) 48,6 %

-трипсин 1,5 %

-фуразолидон 2,5 %

АТНЛ 0.009.240.689

Образцы подвергнуты стерилизации ионизирующим облучением (доза 25 кГр).

4. ВНИИИМТ провел технические испытания лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксibuтирата, содержащих трипсин и фуразолидон и счел возможным зачесть в качестве технических следующие виды предварительных испытаний:

- проверка токсичности, стерильности
- проверка протеолитической активности
- проверка паропроницаемости
- проверка антимикробной активности
- проверка прочности.

5. Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксibuтирата, содержащие трипсин и фуразолидон технические испытания выдержали.

6. Представленная техническая документация соответствует требованиям НД.

Приложение:

1. Протокол технических испытаний.
2. Протоколы предварительных испытаний.

Ведущий по испытаниям



Л.Н. Стасевич

Члены испытательной группы



Н.А.Борисова

АТНЛ 0.009.240.689

## Приложение 1

### ПРОТОКОЛ № 1 технических испытаний

1. Объект испытаний: Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксibuтирата, содержащие трипсин и фуразолидон представленные Московским государственным текстильным университетом им. А.Н.Косыгина, Факультет химической технологии и экологии, г.Москва

2. Дата испытаний: Начало - 27.07.2006 г.  
Окончание - 14.08.2006 г.

3. Цель испытаний: Проверка соответствия технических характеристик лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксibuтирата.

3.1. Проверка технических параметров изделия:

- упаковка, комплектность;
- внешний вид и качество поверхности;
- герметичность упаковки;
- основные размеры (длина, ширина, толщина);
- поверхностная плотность;

5. Применяемые контрольно-измерительные инструменты и аппаратура:

- штангенциркуль, предел измерения 0-200 мм, ГОСТ 166-80;
- толщиномер типа ТИ, ГОСТ 11358-89, с ценой деления 0,01 мм;
- металлическая линейка, ГОСТ 427-75;
- разрывная машина типа РМИ-60, ГОСТ 7762-85.
- весы лабораторные «Sartorius» тип L 420 S

6. Результаты испытаний:

6.1. Упаковка, комплектность.

В комплект поставки входит:

- раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата- 1 шт.,
- упаковка - 1 шт.

АТНЛ 0.009.240.689

Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксипропаноата, содержащие трипсин и фуразолидон упакованы в герметично запаянный пакет из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354-82.

#### 6.2. Внешний вид и качество поверхности.

Лабораторные образцы раневого покрытия на основе полигидроксипропаноата, содержащие трипсин и фуразолидон представляют собой не прозрачную пленку светло-желтого цвета, изготовленную из смеси полимеров и лекарственных веществ. Состав изделия: -полигидроксипропаноат (ПГБ) 48,6 %; -поликапролактон (ПКЛ) 48,6 % ; -трипсин 1,5 %;-фуразолидон 2,5 %.

Поверхность покрытия гладкая, без механических включений и дефектов.

6.3. Результаты проверки основных размеров лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксипропаноата представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Ед. изм.	Номера образцов			Среднее значение
		1	2	3	
1	2	3			4
Длина	см	10,0	10,1	9,9	10,0
Ширина	см	10,0	10,0	10,0	10,0
Толщина	мм	0,60	0,61	0,60	0,60

6.4. Результаты проверки поверхностной плотности опытных лабораторных образцов раневого покрытия на основе полигидроксипропаноата представлены в таблице 2.

Наименование показателя	Ед. изм.	Номера образцов			Среднее значение
		1	2	3	
Поверхностная плотность	г/м <sup>2</sup>	1,53	1,54	1,53	1,53



6.5. Проверка целостности потребительской тары.  
На пакете потребительской тары не выявлены разрывы, трещины и другие повреждения. Потребительская тара целостная.

Ведущий по испытаниям



Л.Н. Стасевич

Члены испытательной группы



Н.А.Борисова

АТНЛ 0.009.240.689



**Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

119992, Россия, Ленинские горы, дом 1, кор. 12  
(095)939-43-09

тел.(095)939-27-76, факс

Протокол лабораторных испытаний

от " 29 " авг 2006 г.

биodeградируемого раневого покрытия на основе  
полигидроксibuтирата

1. Наименование организации, представившей образцы на испытания: МГТУ им А.Н.Косыгина.

2. Наименование и характеристика образцов: биodeградируемое раневоe покрытие на основе полигидроксibuтирата в виде пленки, содержащее трипсин и антимикробное вещество.

3. Методы испытаний: Проверка антимикробного действия образцов осуществлялась методом диффузии в агар (ГФ СССР, XI изд., вып.2. – М., 1990, с.210-225) и в соответствии с Методическими Указаниями по лабораторной оценке антимикробной активности текстильных материалов, содержащих антимикробные препараты МЗ СССР (Москва, 1984 г.) по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus*.

5. Аппаратура и реактивы

Линейка измерительная по ГОСТ 427.

Пинцет по ГОСТ 21341-89.

Микробиологические среды.

№ образца	Толщина пленки мкм	Антимикробное вещество	Количество антимикробного вещества, % от массы пленки	Размер испытуемого образца, мм	Зона задержки роста микроорганизмов, мм
1	200	ХГБГ	1,6	10	3,5
2	200	ПФ	1,6	10	10,3
3	200	ФЗ	2,4	10	3,2
4	50	ХГБГ	1,6	10	4,7
5	50	ПФ	1,6	10	10,4
6	50	ФЗ	2,4	10	5,1
7*	50	ПФ	1,6	10	11,8

Шкаф сушильный электрический круглый с диапазоном температур от +30 °С до +200 °С.

6. Результаты испытаний образцов представлены в таблице.

Таблица

\* Пленка 7 содержала трипсин, модифицированный сшивкой глутаровым альдегидом в присутствии хитозана

ПФ – пefлоксацин, ХГБГ – хлоргексидина биглюконат, ФЗ – фуразолидон

Зав. коллекцией микроорганизмов  
Старший научный сотрудник

Чердынцева Т.А.



ПОДПИСЬ РУКИ  
ЗАВЕРЯЮ

ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО Ф-ТА МГУ





УТВЕРЖДАЮ  
Первый проректор –  
проректор МГТУ по научной работе  
проф. К.И.Кобраков

" \_\_\_\_\_ 2006 г.

## Протокол лабораторных испытаний

от "25" мая 2006 г.

биodeградируемого раневого покрытия на основе  
полигидроксibuтирата

1. Наименование организации, представившей образцы на испытания:  
МГТУ им А.Н.Косыгина.

1. 2. Наименование и характеристика образцов: биodeградируемое раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата, содержащее трипсин и антимикробное вещество фуразолидон, подвергнутое стерилизации ионизирующим облучением (доза 25 кГр).

3. Цель испытаний: Проверка протеолитической активности образцов.

4. Методы испытаний.

Проверка протеолитической активности осуществлялась в соответствии с методикой:

Измельченную навеску пленки ( $\approx 0,2$  г), содержащей трипсин, помещали в 25 мл 0,002 М раствора метилового эфира N – бензоил – L – аргинина в 0,2 М трис – HCl буфере (pH 7,8) и перемешивали. Через каждые 2 мин. отбирали по 1 мл реакционной смеси и измеряли оптическую плотность при длине волны  $\lambda = 253$  нм на спектрофотометре марки «Genesys» фирмы UV/VIS (США). Расчет концентрации N – бензоил – L – аргинина проводили с использованием калибровочной кривой. За единицу активности (Е) трипсина принимали количество мкмоль N – бензоил – L –

аргинина выделившегося в минуту при 20°C и pH 7,8 в результате ферментативного гидролиза. Активность выражали в Е/г пленки.

5. Аппаратура и реактивы

Спектрофотометр марки «Genesys» фирмы UV/VIS (США)

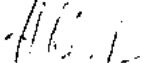
Метилловый эфир N – бензоил – L – аргинина, «Reanal» (Венгрия).

Дистиллированная вода; ГОСТ 6709 – 72.

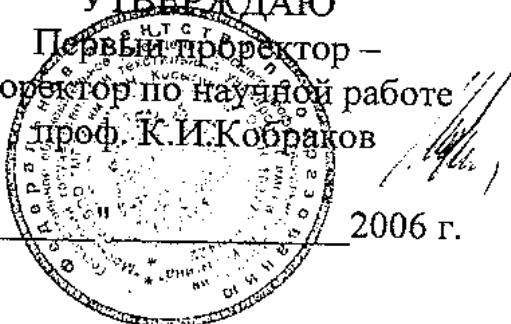
(Трис – гидроксиметил) аминометан (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N) марки ч.д.а. производства фирмы «Reanal» (Венгрия).

6. Результаты испытаний представлены в таблице

№ п.п.	Протеолитическая активность, Е/г пленки	Среднее значение, Е/г пленки
1	2,7	
2	3,0	
3	3,2	
4	3,1	
5	2,8	2,95

Отв. исполнитель:  проф. Кильдеева Н.Р.

УТВЕРЖДАЮ  
Первый проректор –  
проректор по научной работе  
проф. К.И.Кобраков



" \_\_\_\_\_ " 2006 г.

Протокол лабораторных испытаний  
от "25" мая 2006 г.  
биodeградируемого раневого покрытия на основе  
полигидроксibuтирата

1. Наименование организации, представившей образцы на испытания:  
МГТУ им А.Н.Косыгина.

1. 2. Наименование и характеристика образцов: биodeградируемое раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата, содержащее трипсин и антимикробное вещество фуразолидон, подвергнутое стерилизации ионизирующим облучением (доза 25 кГр).

3. Цель испытаний: Проверка паропроницаемости образцов.

4. Методы испытаний.

Проверка паропроницаемости пленок осуществлялась в соответствии с методикой: Образец пленки толщиной  $55 \pm 5$  мкм закрепляли на поверхности стеклянного бюкса диаметром 50 мм, содержащего 30 мл дистиллированной воды. Бюкс помещали в термостат и инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Через каждые 10 мин бюкс взвешивали и определяли скорость потери массы в результате испарения воды. Паропроницаемость выражали в мг воды, испарившейся с  $1 \text{ см}^2$  поверхности пленки в течение 1 часа.

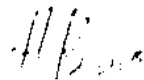
5. Аппаратура и реактивы

Дистиллированная вода; ГОСТ 6709 – 72.

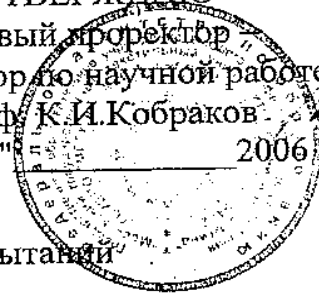
Посуда лабораторная стеклянная ГОСТ 29252-91

6. Результаты испытаний представлены в таблице

№ п.п.	Паропроницаемость, мг/см <sup>2</sup> час	Среднее значение, мг/см <sup>2</sup> час
1	5,3	
2	4,9	
3	5,1	5,0

Отв. исполнитель:  профессор кафедры АФКХ Кильдеева Н.Р.

УТВЕРЖДАЮ  
Первый проректор  
проректор по научной работе  
проф. К.И.Кобраков  
" \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2006 г.



Протокол лабораторных испытаний

от "30" мая 2006 г.

биodeградируемого раневого покрытия на основе полигидроксibuтирата

1. Наименование организации, представившей образцы на испытания:  
МГТУ им А.Н.Косыгина.

1. 2. Наименование и характеристика образцов: биodeградируемое раневое покрытие на основе полигидроксibuтирата, содержащее трипсин и антимикробное вещество фуразолидон; подвергнутое стерилизации ионизирующим облучением (доза 25 кГр).

3. Цель испытаний: Проверка прочности образцов.

4. Методы испытаний.

Проверка прочности пленок осуществлялась в соответствии с ГОСТ 14236-81 со следующими дополнениями: скорость растяжения 100 мм/мин; для испытания на прочность пленки нарезали на полоски длиной 50 мм, а шириной 5 мм.

5. Аппаратура : разрывная машина РМ-30-1.

6. Результаты испытаний представлены в таблице

№ п.п.	Толщина испытуемого образца, мкм	Прочность, МПа (± 5%)
1	55,9	15,1
2	56,9	13,4
3	57,0	16,2
4	61,0	14,0
5	58,1	15,2
	Среднее значение 57,8	Среднее значение 14,8

Зав. кафедрой текстильного  
материаловедения

Отв. исполнитель:

проф. Шустов Ю.С.

доцент Винокурова Т.А.



**Федеральное Государственное унитарное предприятие  
"МОСКОВСКИЙ РАДИОТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК"**

ПРОТОКОЛ № 21 от "14" июня 2006 г.

проведения радиационной стерилизации медицинской продукции (МП),  
изготовленной в МГТУ им. А.Н. Косыгина:

1. Хирургическая масочная сетка с микрокапсулами и шпатель - розетки у Гиряева - 16 шт
2. Рабочие перчатки на основе нитрилового латекса - 9 шт

1. Сопроводительный документ \_\_\_\_\_
2. Номер партии наб. сборки
3. Количество изделий 25 шт (16 кор)
4. Дата поставки для стерилизации 08.06.06
5. Дата и количество изделий, переданных на контроль ИК \_\_\_\_\_
6. Тип радиационно-технологической установки (РТУ) СТЕРУС-1
7. Дата проведения стерилизации 14.06.06
8. Контрольные параметры процесса РС
  - стерилизующая доза \_\_\_\_\_
  - максимально допустимая доза \_\_\_\_\_
  - измеренное значение дозы \_\_\_\_\_
  - в контрольной точке 26,5 кГр
9. Дозиметрический контроль:  
(используемые средства подчеркнуть)
  - рабочий дозиметр - свидетель типа СОПД (Ф) - 5/150
  - цветовой индикатор дозы ЦВИД - 3
10. Параметры РТУ
  - энергия излучения (электроны) 93 МэВ МэВ
  - мощность дозы 1,5 кГр/сек кГр/с
11. Дата и количество изделий, переданных:
  - на микробиологический контроль стерильности \_\_\_\_\_
  - на контроль токсичности \_\_\_\_\_
  - на контроль пирогенности \_\_\_\_\_

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Партия МП № 2201 001430 в количестве 25 шт. прошла

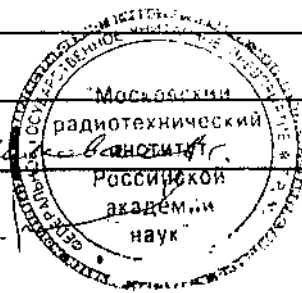
радиационную стерилизацию дозой 26,5 кГр. в соответствии с

Работу провели:

Оператор РТУ Розин В. В.

Дозиметрист Розин В. В.

Начальник стерилизационной установки Шамф. И. И.



И. И.