

## ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И ЕГО СОПОЛИМЕРА С 3-ОКСИВАЛЕРАТОМ РАЗЛИЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ *in vitro*

© 2018 г. В.А. Жуйков\*, А.П. Бонарцев\*\*, Т.К. Махина\*, В.Л. Мышкина\*, В.В. Воинова\*\*, Г.А. Бонарцева\*, К.В. Шайтан\*\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: vsevolod1905@yandex.ru

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: shaytan49@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.09.17 г.

После доработки 02.11.17 г.

Исследована гидролитическая деградация пленок полимеров поли-3-оксибутирата разной молекулярной массы и его сополимеров с 3-оксивалератом (с 9 мол. % вхождением 3-оксивалерата в цепь поли-3-оксибутирата) также различной молекулярной массы в модельных условиях *in vitro*. Изменения физико-химических свойств полимеров были исследованы рядом аналитических методов: вискозиметрии, дифференциально-сканирующей калориметрии, гравиметрическим методом и методом измерения контактного угла смачивания полимеров. Было показано, что в течение шести месяцев наблюдалось незначительное падение массы пленок полимеров. Молекулярная масса образцов снижалась значительно, наибольшее снижение наблюдалось у высокомолекулярного поли-3-оксибутирата – до 80% от начальной молекулярной массы полимера. Поверхность всех исследуемых полимеров стала более гидрофильной. В работе применяли математические модели анализа кинетики гидролитической деградации поли-3-оксисалканоатов по некаталитическому и автокаталитическому механизмам. Также было показано волнообразное изменение степени кристалличности ряда полимеров в процессе деградации *in vitro*. Таким образом, изучаемые полимеры могут быть использованы для создания биоразлагаемых медицинских изделий, способных длительно выполнять свои функции.

*Ключевые слова:* деградация, гидролиз, поли-3-оксибутират, поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат.

Поли-3-оксибутират (ПОБ) – основной полимер гомологичного ряда семейства полиоксисалканоатов (ПОА) – наиболее известный микробиологический полиэфир, который является перспективной альтернативой биоразлагаемым синтетическим термопластикам [1–4] и другим биосовместимым полимерам [4–11]. В отличие от природных полимеров (хитозан, альгинат, декстран, коллаген и т.д.) и химически синтезированных полимеров, ПОБ и его сополимеры получают биотехнологическим путем, который позволяет достичь высокой степени чистоты, задавать и контролировать физико-химические свойства биополимеров в узких пределах в процессе их биосинтеза [2]. Поскольку ПОБ обладает способностью к биоразложению и высокой

биосовместимостью, он широко используется в регенеративной медицине и тканевой инженерии [12–21], а также для изготовления лекарственных форм [22–25]. Свойства ПОБ позволяют создавать композиты этого биополимера с синтетическими полимерами, неорганическими материалами и лекарственными средствами [26–29]. Кроме того, ПОБ является экологически чистым материалом, который можно использовать для производства упаковки и в сельском хозяйстве [30].

Общепризнано, что биodeградация ПОБ как в живых системах, так и в окружающей среде осуществляется посредством ферментативных и неферментативных процессов, которые происходят одновременно в естественных условиях. По сравнению с другими биodeградируемыми полимерами (например, полилактидом и полигликолидом [31]), ПОБ считается умеренно устойчивым к деградации *in vitro*, а также к

Сокращения: ПОБ – поли-3-оксибутират, ПОА – полиоксисалканоаты, ПОБВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат.

биодegradации в тканях животных. На скорость деградации влияют такие характеристики полимера, как химический состав, кристалличность, морфология и молекулярный вес [32,33]. Анализ литературных данных показал широкий разброс, а иногда и значительное расхождение в значениях степени гидролитической деградации ПОА *in vitro* [1]. Причины таких расхождений разнообразны – различная геометрия образцов ПОБ, степень чистоты, молекулярная масса, а также отличия в природе происхождения полимеров. Так, имеются противоречия в данных по потере веса образцов при их гидролитической деструкции, например, при инкубации пленок ПОБ при 37°C и pH 7,4 потеря веса пленок ПОБ составила 7,5% за 50 сут [34], не снижалась за 150 сут [35], не изменялась за 730 сут [36] и 364 сут [37], а как будет показано в данной работе, мы, как и первые авторы [34] наблюдали выраженное падение массы образцов практически в этих же условиях. Также масса не изменялась при повышении температуры до 70°C [37]. Имеются значительные расхождения литературных данных и по изменению молекулярной массы ПОБ при его гидролитической деградации: сходное по величине падение молекулярной массы – до 68% за 150 сут [35] и 64% [36] наблюдается за совершенно разные сроки – соответственно менее полугодом (150 сут) и 2 года (730 сут) инкубации образцов в буферном растворе. В ряде работ было отмечено изменение механических свойств изделий (нити и пластины) из ПОБ в процессе гидролиза [38,39], и здесь также наблюдаются расхождения в данных. Модуль Юнга у шовных нитей из ПОБ не менялся в течение 180 сут при 70°C и pH 7,2, однако напряжение на разрыв и относительное удлинение при разрыве снижались на 36 и 33% соответственно. Иное поведение демонстрируется при физиологической температуре (37°C). За первые 3 месяца (90 сут) напряжение на разрыв и относительное удлинение возрастали на 17 и 16% соответственно. В следующие 90 сут эксперимента происходило постепенное снижение данных характеристик до исходных значений [38]. При измерении механических свойств пластин из ПОБ выяснилось, что их модуль Юнга снижается на 68%, а напряжение на разрыв – на 77% [39]. Одной из групп авторов было показано резкое снижение модуля Юнга, напряжения на разрыв и твердости пластин из ПОА всего за одни сутки – на 32, 13 и 40% соответственно. В течение последующих 28 сут модуль Юнга и твердость не менялись, а напряжение на разрыв вернулось к исходным значениям [40].

Для разработки медицинских изделий на основе ПОБ и его сополимеров необходимо знать, как изменяются физико-химические свойства этих полимеров в процессе их деградации. Для того чтобы понять, какие изменения с полимерами происходят в организме человека в процессе деградации, необходимо исследовать кинетику изменения основных физико-химических свойств при их деградации *in vitro* в условиях, моделирующих внутреннюю среду организма. Таким образом, цель данного исследования – получение, сравнение и анализ кинетических кривых долгосрочной деградации ПОБ и его сополимеров с заданными молекулярной массой и мономерным составом, полученных методом контролируемого бактериального биосинтеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биосинтез полиоксипалканоатов.** Для получения ПОБ и его сополимеров с заданными молекулярной массой и мономерным составом использовали метод контролируемого биосинтеза с помощью высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б, для чего в культуральную среду добавляли регулятор молекулярной массы – ацетат натрия и предшественник мономеров 3-оксипалканерата в составе синтезируемого сополимера ПОБВ – натриевую соль валериановой кислоты. Штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч [35–37,42,45]. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание [42,43].

**Ядерный магнитный резонанс.** Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР 1% (вес/об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сняты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 К, релаксационная задержка 2,5 с, ширина спектрального окна 4000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов  $\text{CDCl}_3$  (7,24 м.д. по тетраметилсилану). Процентное содержание мономеров 3-оксипалканерата в сополимере ПОБВ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы оксипалканерата (0,89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы оксипалканерата (0,89 м.д.) и метильной группы оксипалканерата (1,27 м.д.).

**Изготовление пленок из полиоксипалканоатов.** Для исследования деградации *in vitro* была

изготовлена серия пленок толщиной  $50 \pm 10$  мкм из ПОБ и его сополимеров. Пленки готовили методом полива из раствора хлороформа на дно предварительно обезжиренной чашки Петри. Затем из полученных пленок нарезали пленки меньших размеров ( $3 \times 1$  см).

**Гидролитическая деградация *in vitro*.** Исследование деградации пленок ПОА проводили следующим образом: пленки инкубировали в 15 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) [46] при  $37^\circ\text{C}$  в термостате в течение 183 сут. Данный промежуток времени был выбран ввиду того, что шесть месяцев – среднее время, за которое имплант должен заменяться здоровой тканью организма [47]. Уровень рН контролировали с помощью рН-метра Orion 420+ (Thermo Electron Corporation, США). Для фиксации изменения массы пленок полимера исследуемые пленки вынимали из раствора после недели, одного, трех и шести месяцев инкубации, высушивали и взвешивали на весах. Средняя масса пленок составляла 15–25 мг. Изменение массы пленок в течение деградации определяли гравиметрически на электронных весах AL-64 (Max = 60 г,  $d = 0,1$  мг; ACCULAB, США). Во избежание бактериального вклада в деградацию полимеров в буферный раствор добавляли азид натрия в концентрации 2 г/л, а также меняли буферный раствор дважды в неделю [33,48].

**Изучение свойств полимеров.** Молекулярная масса ПОБ и его сополимеров была определена вискозиметрически. Вязкость раствора полимеров в хлороформе измеряли при  $30^\circ\text{C}$  на вискозиметре RheoTec (RheoTec Messtechnik GmbH, Германия). Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка–Куна–Хаувинка [49].

$$[\eta] = 7,7 \cdot 10^{-5} \cdot M^{0,82}.$$

Для определения  $[\eta]$  экспериментально полученные числовые значения отражали в системе координат, откладывая по оси абсцисс концентрацию раствора полимера ( $C$ ), по оси ординат – значения приведенной вязкости ( $\eta_{уд}/C$ ). Экстраполяцией полученной прямой до оси ординат получали значение характеристической вязкости  $[\eta]$ . Точность определения  $[\eta]$  составляла  $\sim 1\%$ . Точность определения молекулярной массы, вычисленной по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, составляет 2–5% [50].

Молекулярная масса является одним из важнейших и наиболее чувствительным параметром для моделирования деградации биоразлагаемых полимеров [51]. В работе [52] было предложено математическое описание для автокаталитиче-

ского и некаталитического механизмов деградации алифатических полиэфиров. Предполагая, что степень деградации невелика, авторы работы [52] предложили следующую кинетическую зависимость, основанную на средней молекулярной массе полимеров:

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

где  $MM$  и  $MM_0$  – значения средней молекулярной массы компонента полимера в момент времени  $t$  и в начальный момент соответственно,  $k$  – константа скорости.

Также было предложено уравнение, учитывающее автокатализ, который является следствием появления концевых групп карбоновых кислот. Процесс можно описать следующим уравнением:

$$\ln MM = -kt + \ln MM_0. \quad (2)$$

Тепловые свойства пленочных образцов из ПОБ и его сополимеров измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch, Германия). Около 1–3 мг полимерной пленки помещали в алюминиевый тигель. Образцы нагревали от  $25$  до  $220^\circ\text{C}$  при скорости нагрева  $10$  К/мин в атмосфере аргона. Кристалличность структуры ПОБ ( $X_c$ ) рассчитывали следующим образом:

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

где  $\Delta H_m$  – изменения энтальпии, вызванные плавлением исследуемого образца, соответственно,  $\Delta H_{0,m}(\text{ПОБ})$  – теоретическое значение для термодинамической энтальпии плавления для 100%-кристаллических образцов ПОБ ( $146,6$  Дж/г) [11]. Все расчеты проводили для второго цикла нагрева.

Гидрофильность поверхности полимера оценивали путем измерения контактного угла с водой, образующегося между каплями воды и «гладкой» поверхностью образцов, с использованием Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, США). Для этой цели на поверхность пленок наносили каплю дистиллированной воды (10 мкл) и измеряли контактный угол смачивания. Измерения проводили 10 раз [53,54].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Биосинтез полимеров.** В табл. 1 представлены результаты по биосинтезу ПОБ и ПОБВ культурой *A. chroococcum* 7Б при ее выращивании на среде с сахарозой в качестве основного источника углерода, валериановой кислотой в качестве дополнительного источника углерода для синтеза сополимера ПОБВ и ацетата натрия

**Таблица 1.** Параметры биосинтеза и основные характеристики ПОБ и ПОБВ, синтезируемых штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б в культуральной среде с сахарозой в качестве основного источника и добавлением валериановой кислоты и ацетата натрия

Субстрат	Время добавления валериановой кислоты или ацетата натрия в культуральную среду, ч	Урожай биомассы, г/л среды	Содержание ПОА в биомассе, % от сухого веса клеток	Молекулярная масса ПОА, $\times 10^6$ Да	Содержание 3-окси-валерат/3-оксибутират в сополимере, мол. %	Обозначение полученного полимера
Сахароза, 50 мМ	–	$5,8 \pm 0,6$	$83,4 \pm 3,1$	1,70	0	ПОБ 1700
Сахароза + 35 мМ ацетата натрия	0	$4,3 \pm 0,5^*$	$71,7 \pm 3,2^*$	0,48	0	ПОБ 408
Сахароза + 100 мМ ацетата натрия	0	$1,9 \pm 0,6^*$	$58,8 \pm 3,6^*$	0,08	0	ПОБ 82
Сахароза + 10 мМ валериановой кислоты	12	$4,2 \pm 0,5^*$	$73,8 \pm 3,7^*$	1,39	9,0	ПОБВ 9% 1385
Сахароза + 20 мМ валериановой кислоты	0	$3,2 \pm 0,4^*$	$67,7 \pm 3,0^*$	0,82	9,0	ПОБВ 9% 815
Сахароза + 20 мМ валериановой кислоты + 60 мМ ацетата натрия	12/0	$2,6 \pm 0,3^*$	$49,5 \pm 3,2^*$	0,21	9,6	ПОБВ 9,6% 210

Примечание. \* –  $p < 0,05$  при сравнении с группой «Сахароза»,  $n = 8$ .

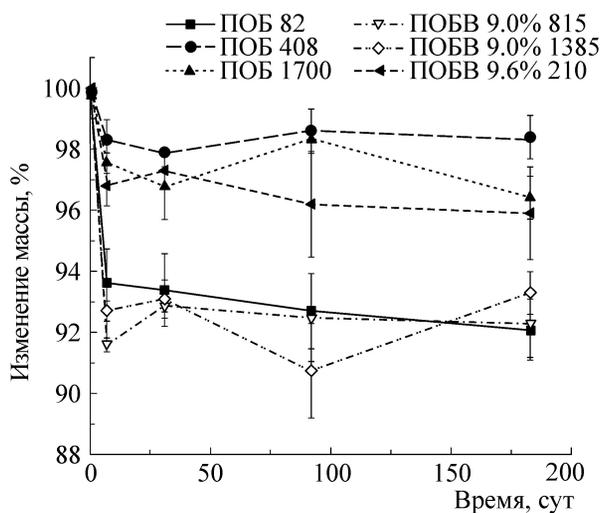
в качестве добавки, регулирующей молекулярную массу синтезируемого полимера.

Таким образом, были получены ПОБ с различной молекулярной массой и ПОБВ с практически одинаковым молярным содержанием 3-оксивалерата (около 9 мол. %), также с различной молекулярной массой.

**Потеря массы пленок полимера.** В организме млекопитающих деградация ПОА происходит

в результате комбинированного процесса гидролитической и ферментативной деградации. Это приводит к изменению веса образцов и их физических и химических свойств [1–3,21–23]. Анализ кривых деградации (рис. 1) показал, что за первую неделю происходило падение массы всех исследуемых образцов. Так, масса низкомолекулярного ПОБ 82 снижалась на ~8% до  $93,6 \pm 1,1\%$ . У полимеров ПОБ 408 и ПОБ 1700 масса пленок уменьшилась до  $98,3 \pm 0,6\%$  и  $97,5 \pm 0,3\%$  от изначальной массы соответственно. У сополимеров масса также уменьшилась: у пленок ПОБВ 9% 815 – до  $91,6 \pm 0,2\%$ , у пленок ПОБВ 9% 1385 – до  $92,7 \pm 0,3\%$  и до  $96,8 \pm 0,6\%$  у пленок ПОБВ 9,6% 210. Такую потерю массы можно, вероятно, объяснить высвобождением из полимерной матрицы водорастворимых олигомеров ПОА [21,22,26].

Впоследствии масса пленок ПОА, помещенных в буферный раствор, значительно не изменялась даже после 180 сут инкубации, что указывает на медленную гидролитическую деградацию. Наибольшую потерю массы за полгода наблюдали у образцов ПОБ 82 – до  $92,1 \pm 1\%$ , ПОБВ 9% 815 кДа – до  $92,3 \pm 1,1\%$  и ПОБВ 9% 1385 – до  $93,3 \pm 0,7\%$  (рис. 1). Полученные результаты соответствуют данным по деградации ПОБ и его сополимеров, полученным другими исследователями [56], которые



**Рис. 1.** Изменение массы полимера в процессе деградации в натрий-фосфатном буфере при 37°C.

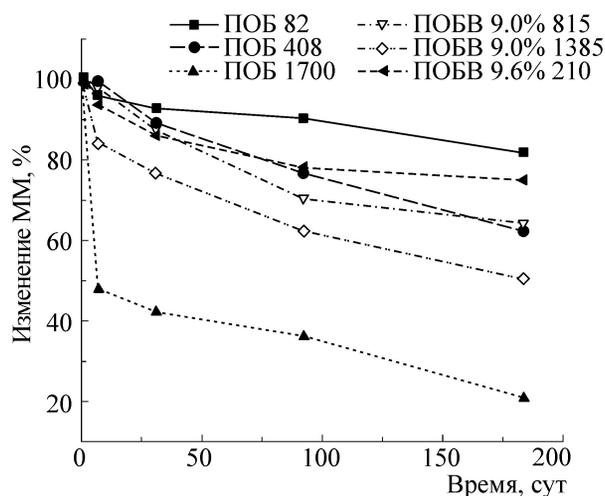


Рис. 2. Изменение молекулярной массы полимеров в процессе гидролитической деструкции.

также не наблюдали значительных изменений массы ПОБ и ПОБВ. Однако в нашем случае изменение массы за первую неделю разложения было более ощутимым.

**Изменение молекулярной массы.** С другой стороны, молекулярная масса всех образцов ПОА постепенно уменьшалась в зависимости от времени деградации (рис. 2). Наиболее значительное снижение молекулярной массы наблюдали у ПОБ 1700 – до 23% от изначальной молекулярной массы, при этом наибольшую потерю молекулярной массы наблюдали за первую неделю – 43%. Возможно, это связано с большим количеством аморфной компоненты в полимере, которая разлагается в 20 раз быстрее, чем кристаллическая [57].

Значительное снижение молекулярной массы ПОА в процессе биodeградации свидетельствовало о том, что деградация полимеров происходила в основном в объеме полимерной матрицы. Также можно заметить, что высокомолекулярные полимеры теряли молекулярную массу быстрее, чем низкомолекулярные. Если объединить по группам полимеры на основе их молекулярной массы, то окажется, что ПОБ 1700 и ПОБВ 9% 1385 теряли молекулярную массу быстрее, чем группа из ПОБВ 9% 815 и ПОБ 408, а они, в свою очередь, быстрее, чем ПОБ 82 и ПОБВ 9,6% 210. Можно предположить, что это связано с затруднением для длинных цепей полимеров образовывать кристаллические структуры, а значит, такие цепи более уязвимы для молекул воды, что соответствует данным других исследователей деградации ПОА [37,56,58,59].

Для анализа кривых уменьшения молекулярной массы ПОБ и его сополимеров в про-

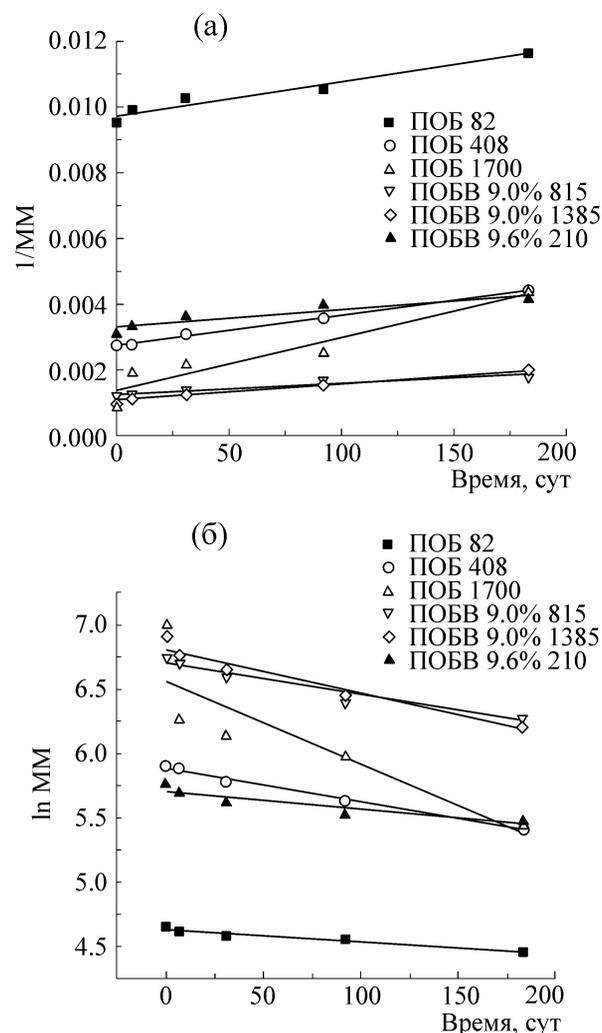


Рис. 3. (а) – Модель некаталитической деградации, (б) – модель автокаталитической деградации.

цессе деградации мы использовали модель разложения частично кристаллических полимеров (уравнения 1 и 2), описанную в работе [52,60], в результате чего были построены следующие графики (рис. 3а,б).

В соответствии с моделями для каждой кривой были найдены коэффициенты корреляции (табл. 2).

Анализируя коэффициенты корреляции, представленные в табл. 2, можно сделать вывод, что коэффициенты корреляции наиболее высокие для некаталитической модели. Однако гомополимеры ПОБ 82, ПОБ 408, а также сополимеры с молекулярной массой 815 и 1385 также показали высокие проценты корреляции для автокаталитической модели (0,93, 0,98, а также по 0,9 соответственно). Отсюда следует, что для данных полимеров свойственна как некаталитическая, так и автокаталитическая мо-

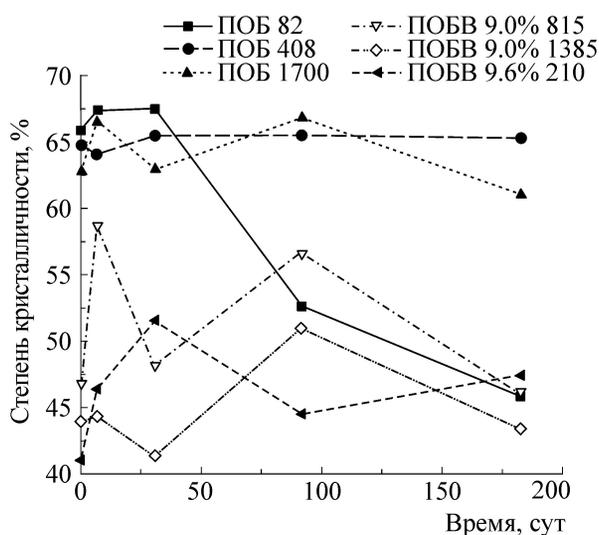
**Таблица 2.** Коэффициенты корреляции некаталитической и автокаталитической модели деградации

Образец	$R^2$ (некаталитическая модель)	$R^2$ (автокаталитическая модель)
ПОБ 82	0,94	0,93
ПОБ 408	0,99	0,98
ПОБ 1700	0,88	0,68
ПОБВ 9,6% 210	0,80	0,77
ПОБВ 9% 815	0,92	0,90
ПОБВ 9% 1385	0,96	0,90

дель убывания молекулярной массы. Похожее поведение частично кристаллических полимеров описано и в работе [52]. Для двух оставшихся полимеров – ПОБ 1700 и ПОБВ 9,6% 210 – в большей степени характерна модель некаталитической деградации.

Полученные результаты соответствуют данным по деградации ПОБ и его сополимеров у других исследователей, где также показаны значительные изменения молекулярной массы в процессе деградации [37,56,58]. Однако для данного класса полимеров впервые были применены модели некаталитического и автокаталитического механизма деградации для частично кристаллических полимеров. В результате было выявлено, что полимерам ПОБ 82 и 408 кДа, ПОБВ 9% 815 и 1385 кДа свойственна как автокаталитическая, так и некаталитическая модель деградации, а для полимеров ПОБ 1700 и ПОБВ 9,6% 210 – некаталитическая модель деградации.

**Степень кристалличности полимера.** Степень кристалличности исследуемых ПОА рассчитывали на основании данных о теплоте плавления

**Рис. 4.** Изменение степени кристалличности ПОА в процессе биодеградации в натрий-фосфатном буфере.

полностью кристаллического ПОБ (146,6 Дж/г) [61]. Важно заметить, что степень кристалличности сополимеров меньше, чем гомополимеров. Это связано с включением в цепь полиоксибутирата мономеров 3-ОВ. Включения этих мономеров с более длинной боковой цепью  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  являются энергетически невыгодными для цепи ПОБ, что и приводит к снижению степени кристалличности [62]. Согласно полученным результатам, за первую неделю степень кристалличности исследуемых полимеров (кроме ПОБ 408) возрастала (рис. 5). Так, степень кристалличности ПОБ 82 увеличилась с 65,9 до 67,4%, для ПОБ 1700 – с 62,8 до 66,5%, у сополимеров ПОБВ 9% 815, ПОБВ 9% 1385 и ПОБВ 9,6% 210 степень кристалличности увеличилась до 58,7, 44,3 и 46,4% соответственно. Предположительно, начальное увеличение степени кристалличности связано с процессом рекристаллизации аморфных участков в полимерах путем разрыва цепи в начальном периоде. При инкубации пленок в течение месяца наблюдали снижение степени кристалличности у полимеров ПОБ 1700, ПОБВ 9% 815, ПОБВ 9% 1385 и ПОБВ 9,6% 210. Понижение степени кристалличности связано, вероятно, с разрывами цепи, происходящими в кристаллических участках полимеров на более поздней стадии. Иная картина изменения степени кристалличности наблюдалась у ПОБ 408. Ее значение после начального периода небольшого падения (с 64,7 до 64,1%) и последующего небольшого повышения (с 64,1 до 65,5%), выходило на относительное плато и в дальнейшем не изменялось на протяжении 180 сут (рис. 4). Степень кристалличности низкомолекулярного ПОБ 82 также демонстрировала иную зависимость: после инкубации в фосфатном буфере в течение месяца наблюдали падение кристалличности вплоть до конца эксперимента. Более того, пленки из данного полимера начали распадаться на части, что свидетельствовало о разрушении целостной структуры полимера в результате деградации.

Во всех остальных случаях наблюдали волнообразное изменение кристалличности. Это

можно объяснить процессами разрыва цепей и последующей их рекристаллизации. При этом молекулы воды гидролизовали сложноэфирную связь в цепочке полимера, образуя высокомолекулярные участки. Далее эти участки подвергались процессу рекристаллизации. Также возможны разрывы и в кристаллических участках цепи [59].

Полученные результаты соответствовали данным по деградации ПОБ и его сополимеров других исследователей, где также говорилось о начальном возрастании степени кристалличности полимеров и последующем ее падении [56]. Однако кривые изменения степени кристалличности, которые имели волнообразный характер, были впервые продемонстрированы в настоящей работе.

#### Изменение гидрофобности пленок полимеров.

Баланс между гидрофобностью и гидрофильностью поверхности является одним из главных параметров, указывающих на биосовместимость поверхности. Биосовместимость же является одним из важнейших свойств полимеров, которые могут быть использованы в медицине, так как степень гидрофильности поверхности является важным параметром для роста клеток [63].

В процессе биodeградации также уменьшался контактный угол между каплей воды и поверхностью пленки полимера, что свидетельствовало о том, что степень гидрофобности исследуемых полимеров снижалась, а значит, повышалась их гидрофильность (рис. 5). Улучшение гидрофильности пленок полимеров связано, вероятно, с тем, что деградация пленок ПОА приводила к расщеплению полимеров на поверхности с высвобождением полярных концевых групп.

Следует отметить, что полученные данные не соответствовали данным по деградации ПОБ и его сополимеров других исследователей, где было показано, что в процессе деградации контактный угол для пленок ПОБ и ПОБВ изменялся незначительно [64]. Возможное объяснение такому факту заключается в различных условиях деградации пленок.

#### ВЫВОДЫ

В данной работе всесторонне было рассмотрено изменение свойств ПОБ и ПОБВ 9% разных молекулярной массы в процессе долгосрочной гидролитической деградации в модельных условиях *in vitro*. Деградацию полимеров исследовали в натрий-фосфатном буферном растворе при 37°C в течение 183 суток. Было

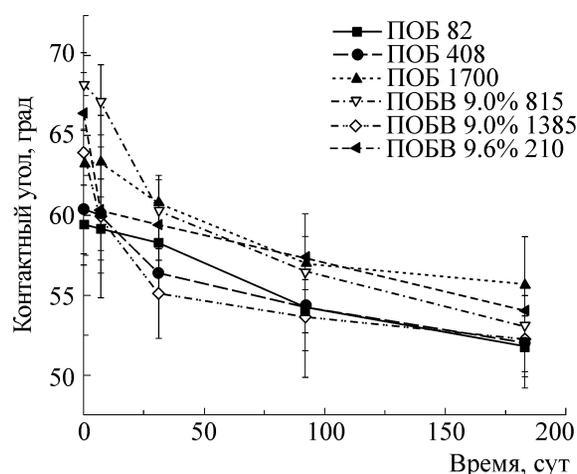


Рис. 5. Изменение степени гидрофобности поверхности пленок ПОА.

выявлено незначительное падение массы исследуемых полимеров. Однако изменение молекулярной массы было гораздо более значительным – продемонстрировано падение молекулярной массы на 80% у высокомолекулярного ПОБ 1700 кДа. Были применены модели некаталитического и автокаталитического механизма деградации. В результате показано, что части полимеров свойственен как автокаталитический, так и некаталитический механизм деградации (ПОБ 82 и 408 кДа, ПОБВ 9% 815 и 1385 кДа) и только некаталитический механизм для полимеров ПОБ 1700 и ПОБВ 9,6% 210. Изменение степени кристалличности полимеров имело периодичность – начальное повышение сменялось снижением, однако степень кристалличности ПОБ 408 кДа практически не изменялась, в то же время кристалличность ПОБ 82 после повышения за первую неделю инкубации до 67,4% падала до 45,9% в течение шести месяцев. Также впервые был продемонстрирован волнообразный характер кривых изменения степени кристалличности. В процессе биodeградации пленки исследуемых полимеров становились более гидрофильными. На основе полученных физико-химических данных по деградации ПОБ и его сополимеров можно констатировать, что изучаемые полимеры могут быть использованы для создания биоразлагаемых медицинских изделий, способных длительно выполнять свои функции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-20104 от 01 августа 2017 г.). При проведении работы использовалось оборудование ЦКП МГУ (в том числе комплекс для получе-

ния микро- и наночастиц полимеров) и ЦКП ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. I. Artsis, A. P. Bonartsev, A. L. Iordanskii, et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **555**, 232 (2012).
2. A. P. Bonartsev, G. A. Bonartseva, K. V. Shaitan, and M. P. Kirpichnikov, *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **5**, 10 (2011).
3. G.-Q. Chen and Q. Wu, *Biomaterials* **26**, 6565 (2005).
4. N. Pramanik, R. Das, T. Rath, and P. P. Kundu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 1613 (2014).
5. T. E. L. Douglas, G. Krawczyk, E. Pamula, et al., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 938 (2016).
6. V. Kaspárková, P. Humpolíček, Z. Capáková, et al., *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **157**, 309 (2017).
7. M. M. Moisenovich, N. V. Malyuchenko, A. Y. Arkhipova, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.* **463**, 232 (2015).
8. M. L. Ramiro-Gutiérrez, J. Will, A. R. Boccaccini, and A. Díaz-Cuenca, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **102**, 2982 (2014).
9. M. G. Raucchi, M. A. Alvarez-Perez, C. Demitri, et al., *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 302 (2012).
10. M. Stevanović, V. Pavlović, J. Petković, et al., *Express Polym. Lett.* **5**, 996 (2011).
11. Y. Zhang, J. Xu, Y. C. Ruan, et al., *Nat. Med.* **22**, 1160 (2016).
12. A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, S. G. Yakovlev, et al., *J. Biomater. Tissue Eng.* **6**, 42 (2016).
13. A. P. Bonartsev, G. A. Bonartseva, T. K. Makhina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 625 (2006).
14. A. A. Olkhov, O. V. Staroverova, A. P. Bonartsev, et al., *Polym. Sci. Ser. D* **8**, 100 (2015).
15. N. V. Andreeva, A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **159**, 567 (2015).
16. S. K. Misra, T. I. Ansari, S. P. Valappil, et al., *Biomaterials* **31**, 2806 (2010).
17. T. Gredes, T. Gedrange, C. Hinüber, et al., *Ann. Anat. – Anat. Anzeiger* **199**, 36 (2015).
18. M. A. C. da Silva, R. N. Oliveira, R. H. Mendonça, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **104**, 106 (2016).
19. A. P. Reyes, A. M. Torres, M. del P. Carreón Castro, et al., *Sci. Rep.* **6**, 31140 (2016).
20. E. I. Shishatskaya, I. V. Kamendov, S. I. Starosvetsky, et al., *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **42**, 344 (2014).
21. S. Ribeiro-Samy, N. A. Silva, V. M. Correlo, et al., *Macromol. Biosci.* **13**, 1576 (2013).
22. E. V. Filatova, S. G. Yakovlev, A. P. Bonartsev, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**, 598 (2012).
23. V. A. Livshits, A. P. Bonartsev, A. L. Iordanskii, et al., *Polym. Sci. Ser. B* **51**, 256 (2009).
24. A. P. Bonartsev, S. G. Yakovlev, E. V. Filatova, et al., *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **6**, 42 (2012).
25. A. P. Bonartsev, A. L. Zernov, S. G. Yakovlev, et al., *Anticancer Agents Med. Chem.* **17**, 434 (2016).
26. F. M. Miroiu, N. Stefan, A. I. Visan, et al., *Appl. Surf. Sci.* **355**, 1123 (2015).
27. E. Biazar and S. Heidari Keshel, *ASAIO J.* **61**, 357 (2015).
28. A. C. Levine, G. W. Heberlig, and C. T. Nomura, *Int. J. Biol. Macromol.* **83**, 358 (2016).
29. A. P. Reyes, A. M. Torres, P. Carreón, et al., *Nat. Publ. Gr.* **6**, 1 (2016).
30. R. W. Lenz and R. H. Marchessault, *Biomacromolecules* **6**, 1 (2005).
31. R. N. Shirazi, F. Aldabbagh, W. Ronan, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27**, 154 (2016).
32. X. Song, F. Liu, and S. Yu, *Catal. Today* **276**, 145 (2016).
33. A. P. Bonartsev, A. P. Boskhomdgiev, A. L. Iordanskii, et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **556**, 288 (2012).
34. I. I. Muhamad, L. K. Joon, and M. A. M. Noor, *Malaysian Polym. J.* **1**, 39 (2006).
35. N. Koyama and Y. Doi, *Can. J. Microbiol.* **41** (Suppl. 1), 316 (1995).
36. C. Kunze, H. E. Bernd, R. Androsch, et al., *Biomaterials* **27**, 192 (2006).
37. T. Freier, C. Kunze, C. Nischan, et al., *Biomaterials* **23**, 2649 (2002).
38. N. D. Miller and D. F. Williams, *Biomaterials* **8**, 129 (1987).
39. C. Doyle, E. T. Tanner, and W. Bonfield, *Biomaterials* **12**, 841 (1991).
40. S. Coskun, F. Korkusuz, and V. Hasirci, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**, 1485 (2005).
41. A. Bonartsev, S. Yakovlev, A. Boskhomdzhev, et al., *PLoS One* **8**, e57200 (2013).
42. V. L. Myshkina, D. A. Nikolaeva, T. K. Makhina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **44**, 482 (2008).
43. V. L. Myshkina, E. A. Ivanov, D. A. Nikolaeva, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**, 289 (2010).
44. A. P. Bonartsev, S. G. Yakovlev, I. I. Zharkova, et al., *BMC Biochem.* **14**, 12 (2013).
45. A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, S. G. Yakovlev, et al., *Prep. Biochem. Biotechnol.* **47**, 173 (2017).
46. G. A. Evans, *Cell* **61**, 17 (1990).
47. D. W. Hutmacher, *Biomaterials* **21**, 2529 (2000).
48. A. P. Boskhomdzhev, A. P. Bonartsev, T. K. Makhina, et al., *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **4**, 177 (2010).
49. R. H. Marchessault, K. Okamura, and C. J. Su, *Macromolecules* **3**, 735 (1970).
50. С. Р. Рафиков, В. П. Будтов, и Ю. Б. Монаков, *Введение в физико-химию растворов полимеров* (Наука, Москва, 1978).
51. A. Göpferich, *Biomaterials* **17**, 103 (1996).
52. C. G. Pitt and Z. Gu, *J. Control. Release* **4**, 283 (1987).
53. A. P. Bonartsev, S. G. Yakovlev, I. I. Zharkova, et al., *BMC Biochem.* **14**, 12 (2013).



54. A. Bonartsev, S. Yakovlev, A. Boskhomdzhev, et al., PLoS One **8**, e57200 (2013).
55. G. G. Choi, H. W. Kim, and Y. H. Rhee, J. Microbiol. **42**, 346 (2004).
56. J. Han, L. P. Wu, X. B. Liu, et al., Biomaterials **139**, 172 (2017).
57. K. Sudesh, H. Abe, and Y. Doi, Prog. Polym. Sci. **25**, 1503 (2000).
58. P. Kanmani, K. Kumaresan, J. Aravind, et al., Int. J. Environ. Sci. Technol. **13**, 1541 (2016).
59. J. Pan, in *Model. Degrad. Bioresorbable Polym. Med. Devices* (Elsevier, 2015).
60. N. A. Weir, F. J. Buchanan, J. F. Orr, and G. R. Dickson, Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med. **218**, 307 (2004).
61. P. J. Barham, A. Keller, E. L. Otun, and P. A. Holmes, J. Mater. Sci. **19**, 2781 (1984).
62. W. J. Orts, R. H. Marchessault, and T. L. Bluhm, Macromolecules **24**, 6435 (1991).
63. M. Domínguez-Díaz, A. Meneses-Acosta, A. Romo-Uribe, et al., Eur. Polym. J. **63**, 101 (2015).
64. T. G. Volova, A. N. Boyandin, A. D. Vasiliev, et al., Polym. Degrad. Stab. **95**, 2350 (2010).

## Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Its Copolymer with 3-Hydroxyvalerate of Different Molecular Weights *in vitro*

V.A. Zhuikov\*, A.P. Bonartsev\*\*, T.K. Makhina\*, V.L. Myshkina\*, Voinova V.V.\*, G.A. Bonartseva\*, and K.V. Shaitan\*\*

\*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

\*\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

The hydrolytic degradation of polymer films of poly(3-hydroxybutyrate) with different molecular weights and its copolymers with 3-hydroxyvalerate (with 9 mol. % of 3-hydroxyvalerate in the chain of poly(3-hydroxybutyrate)) of different molecular weights in model conditions was studied *in vitro*. The changes within the physicochemical properties of polymers were investigated using different analytical techniques: viscosimetry, differential scanning calorimetry, gravimetric method, and water contact angle measurement for polymers. The data obtained showed that in a period of 6 months the mass of polymer films was insignificantly decreased. The molecular weight of the samples reduced significantly, more rapid reduction of up to 80% of the initial molecular weight of the polymer was observed in the high molecular weight poly(3-hydroxybutyrate). The surface of all investigated polymers became more hydrophilic. In this work, we focus on mathematical models that can be used for the analysis of the kinetics of hydrolytic degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s by noncatalytic and autocatalytic hydrolysis reaction mechanisms. Also, it was shown that the degree of crystallinity of some polymers changes differently during degradation process *in vitro*. Thus, the studied polymers can be used to develop biodegradable medical devices so that they could perform their functions for a long period of time.

*Keywords:* degradation, hydrolysis, poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)