

УДК 57.013

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПЛЕНОК БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

В.В. Воинова¹, Е.А. Акулина¹, А.А. Дудун², К.А. Меньших¹, А.П. Бонарцев², Д.В. Чеснокова¹, Т.К. Махина², Г.А. Бонарцева², И.Г. Чишанков³, Т.М. Жданко³, В.И. Куликовская³, К.В. Шайтан¹, В.Е. Агабеков³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

³ Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

Поли-3-оксибутират (ПОБ), основной полимер гомологичного ряда полиоксиалканоатов (ПОА) – наиболее известный микробиологический полиэфир, который является перспективной альтернативой биоразлагаемым синтетическим термопластикам и другим полимерам медицинского назначения. 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. ПОБ является частично кристаллическим полимером, что значительно влияет на его основные свойства: термофизические, механические свойства, скорость биodeградации, биосовместимость, а также нано- и микроструктуру изготавливаемых на его основе изделий [1].

Перспективными материалами для клеточной и тканевой инженерии являются полимерные микроструктурированные пленки, размер пор в которых соизмерим с размером клеток [2]. Известно [2], что изменяя размер пор можно регулировать рост клеток на таких сетчатых структурах. Перспективным подходом к созданию упорядоченных микросеток с гексагональной симметрией ячеек является их получение путем «самоорганизации» микрокапель воды в жидкой полимерной пленке [3]. Данный подход заключается в обработке жидкой полимерной пленки, сформированной на какой-либо поверхности, влажным воздухом. Этот метод прост в практическом исполнении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования и позволяет формировать полимерные структуры с регулируемым размером пор и степенью их упорядоченности.

Целью данной работы являлось получение пористых пленок на основе ПОБ методом «самоорганизации» микрокапель воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения ПОБ с заданными молекулярной массой использовали метод контролируемого биосинтеза с помощью высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б, для чего в культуральную среду добавляли регулятор молекулярной массы – 50 мМ ацетата натрия. Штамм-продуцент культивировали в течение 72. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание.

Величину молекулярной массы (ММ) ПОБ определяли методом капиллярной вискозиметрии и вычисляли по уравнению Марка – Хаувинка – Куна. Теплофизические характеристики ПОБ (температуры плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации) измеряли с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии согласно. Температуру начала и максимума пика плавления или кристаллизации обозначали как $T_{пл.}^0$, $T_{пл.}^{пик}$ и $T_{кр.}^{пик}$, соответственно. Кристалличность ПОА (Xс) рассчитывали согласно:

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

где $\Delta H_m^0(ПОБ)$ – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая у 100 % кристаллического ПОБ могла составить 146.6 Дж/г, а $\Delta H_m(ПОА)$ – экспериментальная энтальпия плавления соответствующего образца ПОА.

Механические свойства пленок полимера (модуль Юнга (E) и удлинение при разрыве) определяли на универсальном динамометре Инстрон (Zwick Roell, Германия). Гидрофильность поверхности полимерных пленок оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки, с помощью цифрового угломера Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, США) [4].

Получение микроструктурированных сетчатых пленок ПОБ осуществлялось следующим образом: каплю раствора полимера в хлороформе наносили на поверхность кремниевой подложки. Через 5–10 сек на полученную жидкую полимерную пленку действовали потоком воздуха с относительной влажностью 75 % и температурой 30 °С. Необходимая влажность воздуха создавалась путем его барботирования через насыщенный водный раствор хлорида натрия, температура которого регулировалась с помощью водяного термостата. Поток воздуха подавался перпендикулярно к поверхности жидкой полимерной пленки. Концентрацию раствора ПОБ, наносимого на подложку, варьировали от 10 до 50 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Физико-химические свойства ПОБ, полученного биотехнологическим путем представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства пленок ПОА.

Образец	ММ, $\times 10^3$ г/моль	$T_{кр. \text{ пнк}}, ^\circ\text{C}$	$T_{пл.}^0 / T_{пл. \text{ пнк}}, ^\circ\text{C}$	$X_c, \%$	Е, ГПа	Удлинение на разрыв, %	Контактный угол, $^\circ$
ПОБ	364	87	159/176	65	2,0	4,5	60

Таким образом, полученный полимер обладает относительно высокой степенью кристалличности, жесткостью и гидрофобностью.

Установлено, что методом «самоорганизации» микрокапель воды из ПОБ можно сформировать сетчатые пленки, при этом их морфология зависит от концентрации полимера в растворе. Так, при использовании высоких концентраций (40 мг/мл) образуются пленки с размером ячеек 1–1,5 мкм (рис. 1а). Уменьшение концентрации ПОБ в растворе приводит к снижению упорядоченности структуры: пленка представляет собой сплошные полимерные «островки» размерами 20–40 мкм, которые соединяются порами диаметром 8–20 мкм (рис. 1б).

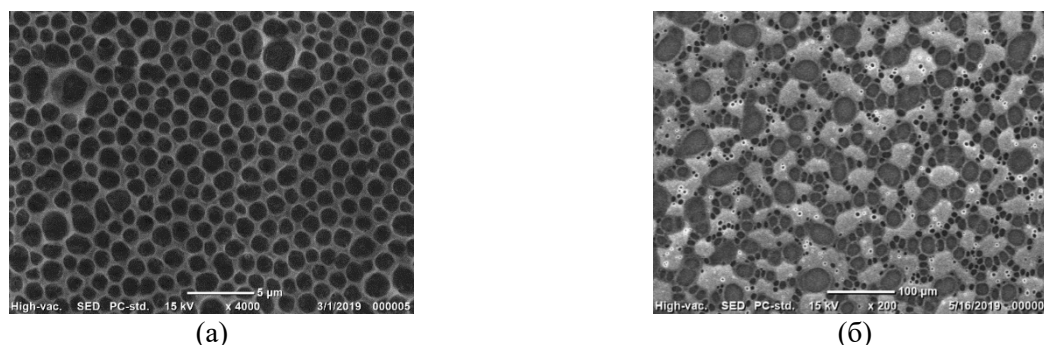


Рисунок 1. СЭМ-изображения пленок ПОБ, полученных из растворов в хлороформе с концентрацией 40 (а) и 10 (б) мг/мл

Таким образом, в данной работе показана принципиальная возможность формирования из ПОБ сетчатых пленок с различной морфологией. Полученные структуры являются перспективными для создания поверхностей с различной топографией с целью регулирования и исследования миграции, пролиферации и дифференцировки клеток разных типов, в частности, мезенхимальных стволовых клеток для клеточной и тканевой инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

- Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиалканогатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. 2019. V. 11. N. 41 P. 4–16.
- Nishikawa et al. Fabrication of honeycomb film of an amphiphilic copolymer at the air–water interface // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 5734–5740.
- Куликовская, В.И. Получение сетчатых микроструктурированных тонкопленочных материалов из нитроцеллюлозы // Материалы. Технологии. Инструменты. 2010. Т. 15. № 4. С. 84–87.
- Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017. V. 47. N. 2. P. 173–184.