

**СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**Т. Г. ВОЛОВА, В. И. СЕВАСТЬЯНОВ, Е. И. ШИШАЦКАЯ**

# **ПОЛИОКСИАЛКАНОАТЫ (ПОА) – БИОРАЗРУШАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ**

**НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР  
АКАДЕМИК  
В. И. ШУМАКОВ**

Подготовка монографии выполнена при поддержке Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (CRDF), грант © REC-002; издание – при частичной поддержке Международного научно-технического фонда (ISTC) по проекту 2218.



**Новосибирск  
Издательство СО РАН  
2003**

УДК 615.46.015  
ББК 28.072.0  
В 68

**Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. / Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины. – Новосибирск, Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.**

ISBN 5-7692-0608-X

Монография посвящена обобщению новейших литературных данных и результатов авторов по биотехнологии и медицинскому материаловедению полиоксиалканоатов (ПОА) – биосовместимых и биоразрушающихся материалов нового поколения, перспективных для применения в различных областях медицины. Дано общее представление о современных материалах медицинского назначения. Рассматриваются конкретные примеры применения биоматериалов в медицинских изделиях и место полиоксиалканоатов среди них. Обобщены результаты авторов, полученные в ходе исследования полиоксиалканоатов отечественного происхождения, синтезированных бактериями *Ralstonia eutropha* B5786, охарактеризованы физико-химические свойства полимеров и механо-физические свойства изделий медицинского назначения; представлены результаты исследований *in vitro* и *in vivo*, показавшие биологическую совместимость ПОА на уровне клеток, тканей и организма. Представлены новейшие литературные данные по биотехнологии и медицинскому материаловедению полиоксиалканоатов, включая тканевую инженерию, трансплантологию, сердечно-сосудистую хирургию, урологию, челюстно-лицевую хирургию и др.

Книга адресована медикам и фармакологам, материаловедам и биотехнологам, а также преподавателям и студентам медицинских, биологических и химических факультетов университетов.

Рецензенты:

Заведующий отделением реконструктивной хирургии  
для больных гемофилией  
Гематологического научного центра РАН,  
доктор медицинских наук, профессор Ю. Н. Андреев.

Руководитель лаборатории химии и технологии материалов  
для сердечно-сосудистой хирургии  
Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева,  
доктор биологических наук, профессор С. П. Новикова.

Утверждено к печати  
Институтом биофизики СО РАН

© Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая, 2003  
© Институт биофизики СО РАН, 2003

ISBN 5-7692-0608-X

Научное издание

**ВОЛОВА** Татьяна Григорьевна  
**СЕВАСТЬЯНОВ** Виктор Иванович  
**ШИШАЦКАЯ** Екатерина Игоревна

**ПОЛИОКСИАЛКАНОАТЫ  
(ПОА) –  
БИОРАЗРУШАЕМЫЕ  
ПОЛИМЕРЫ  
ДЛЯ  
МЕДИЦИНЫ**

---

ЛР № 020909 от 01.09.99

Сдано в набор 14.07.03. Подписано в печать 11.08.03  
Формат 60×84/16. Гарнитура Ариал. Уч.-изд. л. 20.6  
Усл. печ. л. 21.5. Тираж 200. Заказ № 54.

---

Издательство СО РАН

630090, Новосибирск, Морской пр., 2  
Отпечатано в типографии Института физики СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок

Электронная версия расположена на сайте КрасГУ  
<http://www.lan.krasu.ru/studies/editions.asp>

## ПРЕДИСЛОВИЕ НАУЧНОГО РЕДАКТОРА



Несмотря на значительный прогресс в разработке искусственных органов, их клиническое применение ограничено только временным поддержанием функций жизненно важных органов. Основной надеждой хирурга при спасении жизни пациента продолжает оставаться трансплантация донорской почки, печени, сердца и других органов. Однако этот путь не является кардинальным не только из-за риска отторжения транспланта-

та, но и в связи с острой нехваткой донорских органов.

Анализ работ в области трансплантологии и искусственных органов, появившихся к концу XX – началу XXI столетия, приводит к выводу о появлении принципиально нового подхода к восстановлению функций жизненно важных органов, заключающегося в использовании технологий генной, клеточной и тканевой инженерии. Достижения молекулярной и клеточной биологии открыли широкие перспективы для создания принципиально новых и эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным решение многих проблем восстановления поврежденных тканей и органов и лечения ряда тяжелых заболеваний человека. Успешное внедрение в практику экспериментальной биологии и медицины методов длительного культивирования клеток, в том числе клеток-предшественников специализированных тканей, создали предпосылки для разработки новых технологий заместительной клеточной и тканевой терапии и конструирования биоискусственных органов.

Проводимые в этом русле исследования можно подразделить на две группы. К первой относится разработка биоискусственных (гибридных) органов и тканей, ко второй – клонирование органов и тканей из собственных стволовых клеток пациента *in vitro*.

В настоящее время основной акцент новейших биомедицинских направлений все более смещается в сторону поиска технологий, ориентированных на конструирование биоискусственных органов на основе биоразрушающихся полимерных материалов с функционирующими клетками органов и тканей.

Конструирование временных биodeградируемых каркасов (матрикс) для гибридных органов представляет собой сложную задачу. Особенности биоискусственных материалов, применяемых для создания подобных биоискусственных конструкций, являются абсолютная их биосовместимость и безвредность для организма-хозяина и контролируемое время биорезорбции в организме

с постепенным замещением в строго заданные сроки нативными клетками и тканями поврежденного или больного органа. Ключевым моментом в этом направлении является наличие адекватного материала, используемого в качестве матрицы (инкубатора) для культивирования клеток и формирования тканей *in vitro* для последующей имплантации конструкции.

Среди известных биodeградируемых синтетических и природных материалов (хитозаны, коллагены, полимеры и сополимеры полилактидов и полигликолактидов и др.) особое место в настоящее время занимают полиэфиры бактериального происхождения, так называемые полиоксиалканоаты.

Сферы применения полиоксиалканоатов в медицине потенциально широки и включают восстановительную хирургию и клеточную трансплантологию, изготовление медицинского инструментария и вспомогательных средств (нетканые и одноразовые изделия, шовные и перевязочные материалы), фармакологию (контролируемые системы доставки лекарственных средств) и т. д. Особо перспективным считается использование полиоксиалканоатов в качестве матриксов для биоискусственных органов.

Биомедицинские исследования полиоксиалканоатов до последних лет выполнялись исключительно за рубежом с применением биополимеров Biopol<sup>®</sup>, DegraPol/btc<sup>®</sup>, производимых известными фирмами. В России целенаправленные медико-биологические исследования полиоксиалканоатов были начаты Институтом биофизики СО РАН (Красноярск) и Институтом трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ (Москва) в конце 90-х гг.

Монография посвящена обобщению новейших данных по различным аспектам биомедицинского материаловедения полиоксиалканоатов, включая биотехнологию их получения, физико-химические и медико-биологические свойства и применение. Значительное место в ней занимают результаты собственных исследований авторов. Выход в свет первой отечественной монографии, посвященной этому новому и чрезвычайно перспективному классу биополимеров весьма своевременен. Надеюсь, что это издание не только явится стимулом для работ, связанных с конструированием биоискусственных органов и клеточной трансплантологией, но также будет полезным для многих специалистов, имеющих отношение к исследованиям и применению материалов медицинского назначения.



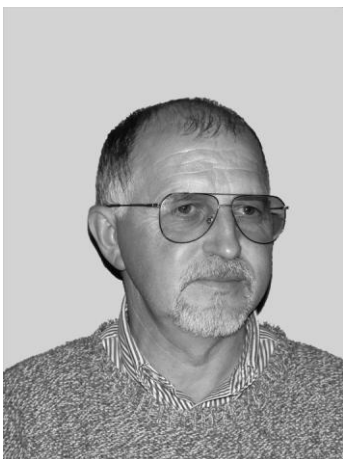
академик  
**В. И. Шумаков**



Волова Татьяна Григорьевна, биолог, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза, заместитель директора Института биофизики СО РАН (Красноярск), профессор кафедры физиологии и биотехнологии Красноярского государственного университета; специалист в области физиологии и микробной биотехнологии; разработчик технологии биосинтеза белка одноклеточных на водороде, организатор и руководитель работ по разрушаемым биополимерам; автор 120 печатных работ, в том числе 2 монографий, 2 учебников для университетов, 6 патентов; член специализированного Ученого Совета Института биофизики СО РАН и Сибирского технологического университета; Научных

Советов РАН по Микробиологии и Биотехнологии.

Адрес: 660036, Красноярск, Академгородок, Институт биофизики СО РАН. Тел: (7)-(3912)-494428; факс: (7)-(3912)-433400. e-mail: volova@ibp..ru



Севастьянов Виктор Иванович, биофизик, доктор биологических наук, профессор, руководитель Государственного Центра по исследованию биоматериалов НИИ трансплантологии и искусственных органов (НИИ-ТиИО) Минздрава РФ (Москва), профессор кафедры «Физика живых систем» факультета молекулярной и биологической физики Московского физико-технического Государственного университета; специалист в области разработок и исследований биосовместимых материалов и изделий медицинского назначения, в том числе, искусственных и биоискусственных органов, систем доставки лекарственных веществ; автор 150 печатных работ, включая 13 брошюр и монографий, 25 авторских свидетельств и патентов; член специализированного Ученого Совета НИИТиИО; член международ-

ного (ISAO) и американского (ASAIO) обществ искусственных органов; член редколлегии международных журналов «Journal of Biomedical Material Research», «Trends in Biomaterials & Artificial Organs» и отечественных журналов «Перспективные материалы» и «Вестник трансплантологии и искусственных органов».

Адрес: 123182, Москва, Щукинская, д. 1, НИИ трансплантологии и искусственных органов, Тел: (7)-(095)- 196 8874. Факс: (7)-(095)-190 2515. e-mail: viktor@cityline.ru



Шишацкая Екатерина Игоревна, врач, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Института биофизики СО РАН (Красноярск); специалист в области биodeградируемых биополимеров, полимерных имплантатов и систем депонирования лекарственных средств; автор цикла приоритетных медико-биологических исследований отечественных полиоксисалканоатов и изделий из них; автор 24 научных работ.

Адрес: 660036, Красноярск, Академгородок, Институт биофизики СО РАН. Тел: (7)-(3912)-494428; факс: (7)-(3912)-433400. e-mail: lhab@ibp.ru.

## Оглавление

|   |     |
|---|-----|
| Введение .....  | 8   |
| Глава 1. МАТЕРИАЛЫ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ .....  | 11  |
| 1.1. Общие представления о биосовместимых материалах .....  | 11  |
| 1.2. Основные подходы к созданию биосовместимых материалов .....  | 13  |
| 1.3. Области применения искусственных материалов .....  | 15  |
| 1.3.1. Материалы для сердечно-сосудистой хирургии .....   | 15  |
| 1.3.2. Материалы для протезов кровеносных сосудов .....   | 17  |
| 1.3.3. Синтетические биodeградируемые материалы .....   | 19  |
| 1.3.4. Материалы для ортопедии и стоматологии .....   | 21  |
| 1.3.5. Сорбенты .....   | 24  |
| 1.3.6. «Интеллектуальные» материалы и биоматериалы<br>для гибридных (биоискусственных) органов и тканей ..... | 25  |
| Глава 2. ПОЛИОКСИАЛКАНОАТЫ – ПРИРОДНЫЕ ПОЛИЭФИРЫ<br>НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ .....                                    | 37  |
| 2.1. История открытия и развития исследований полиоксиалканоатов ..   | 38  |
| 2.2. Разнообразие полиоксиалканоатов .....  | 50  |
| 2.3. Биохимические пути синтеза полиоксиалканоатов .....  | 59  |
| 2.4. Генетика внутриклеточной системы синтеза ПОА .....   | 63  |
| 2.5. Продуценты полиоксиалканоатов .....  | 66  |
| 2.5.1. Природные штаммы – продуценты ПОА .....  | 68  |
| 2.5.2. Генетически модифицированные организмы – продуценты ПОА .....  | 85  |
| 2.6. Субстраты и способы биосинтеза полиоксиалканоатов .....  | 92  |
| Глава 3. СВОЙСТВА ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ .....  | 104 |
| 3.1. Молекулярная структура и физико-химические свойства ПОА .....  | 104 |
| 3.1.1. Поли-3-оксибутират (3-ПОБ) .....   | 105 |
| 3.1.2. Кристаллизация 3-ПОБ .....   | 106 |
| 3.1.3. Молекулярная структура и радиационная устойчивость ПОА .....   | 109 |
| 3.1.4. Молекулярная динамика полимерных макроцепей .....  | 115 |
| 3.1.5. Молекулярная масса ПОБ .....   | 118 |
| 3.1.6. Температурные свойства ПОБ .....   | 119 |
| 3.2. Многокомпонентные полиоксиалканоаты .....  | 121 |
| 3.2.1. Сополимеры 4-ПОБ-со-3-ПОБ .....  | 121 |
| 3.2.2. Сополимеры 3-ОБ-со-3-ОВ .....  | 124 |
| 3.2.3. Сополимеры 3-ПОГ-со-3-ПОО .....  | 131 |
| 3.2.4. Трехкомпонентные ПОА .....   | 133 |
| 3.3. Диэлектрическая проницаемость ПОА .....  | 140 |
| 3.3.1. Диэлектрическая проницаемость твердотельных ПОА .....  | 140 |
| 3.3.2. Диэлектрические характеристики растворов ПОА .....   | 145 |

|  |     |
|--|-----|
| Глава 4. ПОЛУЧЕНИЕ СМЕСЕЙ И КОМПОЗИТОВ<br>ИЗ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ<br>И ПЕРЕРАБОТКА В ИЗДЕЛИЯ ..... | 153 |
| 4.1. Смеси и композиты на основе полиоксиалканоатов .....  | 153 |
| 4.2. Процессы переработки полиоксиалканоатов .....   | 159 |
| 4.2.1. Роль нуклеирующих агентов в процессах кристаллизации ПОА .....                            | 159 |
| 4.2.2. Роль пластификаторов.....   | 161 |
| 4.2.3. Реология расплавов ПОА и ее влияние на переработку .....                                  | 162 |
| 4.3. Получение изделий из полиоксиалканоатов.....  | 165 |
| 4.3.1. Волокна из полиоксиалканоатов .....   | 166 |
| 4.3.2. Полимерные пленки и мембраны из ПОА .....   | 169 |
| 4.3.3. Микрочастицы на основе ПОА .....  | 173 |
| 4.3.4. Нанокompозиты .....   | 175 |
| 4.3.5. Использование ПОА для получения пористых конструкций<br>для тканевой инженерии .....      | 178 |
| 4.4. Стерилизация изделий из полиоксиалканоатов .....  | 182 |
| Глава 5. БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ .....  | 186 |
| 5.1. Биодegradация ПОА в модельных и природных средах.....                                       | 186 |
| 5.2. Биодegradация ПОА в биологических средах <i>in vitro</i> .....                              | 193 |
| 5.3. Биоабсорбция ПОА <i>in vivo</i> .....   | 197 |
| Глава 6. БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ.....  | 203 |
| 6.1. Исследование биосовместимости полиоксиалканоатов <i>in vitro</i> .....                      | 205 |
| 6.2. Гемосовместимые свойства ПОА .....  | 214 |
| 6.3. Результаты исследования биосовместимости ПОА <i>in vivo</i> .....                           | 221 |
| 6.3.1. Биологическое воздействие ПОА <i>in vivo</i> .....  | 223 |
| 6.3.2. Реакция тканей на имплантацию ПОА .....   | 230 |
| Глава 7. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ .....   | 245 |
| 7.1. Использование полиоксиалканоатов в медицине .....   | 246 |
| 7.1.1. Сердечно-сосудистая хирургия .....  | 248 |
| 7.1.2. ПОА в челюстно-лицевой хирургии .....   | 255 |
| 7.1.3. Ортопедия .....   | 258 |
| 7.1.4. Другие хирургические применения ПОА.....  | 260 |
| 7.2. Перспективы применения ПОА в фармакологии.....  | 262 |
| 7.2.1 Таблетированные формы .....  | 262 |
| 7.2.2. Микроинкапсулирование и носители лекарств на основе ПОА .....                             | 264 |
| 7.3. Возможные сферы применения полиоксиалканоатов .....   | 268 |
| Заключение .....   | 271 |
| Литература.....  | 273 |



## Введение

Разработка и освоение новых, экологически чистых материалов, включающихся в биосферные круговоротные циклы, соответствует концепции экологически безопасного устойчивого промышленного развития. В «Повестке 21 века», принятой в 1991 г. на специальной конференции ООН по окружающей среде и развитию, акцентировано внимание на необходимость разработки и внедрения новых экологически безопасных материалов.

Полимерные материалы необходимы для различных сфер человеческой деятельности. Среди них – известные и широко применяемые синтетические материалы и полимеры биологического происхождения, так называемые биополимеры. Синтетические полимеры (нейлон, полиэтилен, полиуретан) совершили революцию в нашем образе жизни, но их применение создает ряд проблем. Во-первых, синтетические полимеры получают из невозобновляемых ресурсов; во-вторых, применение не разрушаемых в природной среде пластиков и их накопление ведет к загрязнению окружающей среды и создает глобальную экологическую проблему.

Объемы выпуска не разрушаемых в природной среде синтетических пластмасс, главным образом полиолефинов (полиэтилена, полипропилена и др.), получаемых в экологически тяжелых процессах нефтеоргсинтеза, а также полистеринов, огромны и ежегодно возрастают примерно на 25 млн тонн. При этом основная их часть складировается на свалках, т. к. повторной переработке в развитых странах подвергается не более 16–20 %. В настоящее время объемы производства полиолефинов достигли 150 млн тонн в год (Rudolph, 1994; Braunegg et al., 1998). Рассматриваемые проекты возможной реутилизации химических пластиков неоптимистичны (Stein, 1992; Фомин, Гужев, 2001). Поэтому радикальным решением проблемы «полимерного мусора» является освоение полимеров, способных при соответствующих условиях биodeградировать на безвредные для живой и неживой природы компоненты.

Основными тенденциями в современной индустрии полимеров является создание новых экологически чистых полимерных материалов с широким спектром полезных свойств. Направление поиска в последние годы смещается в сторону производства не аккумулируемых в природной среде материалов, разрушаемых в естественных биологических процессах, то есть вписывающихся в биосферные круговоротные циклы. В этой связи большую актуальность приобрели работы по биополимерам (полимерам биологического происхождения). Биополимеры подразделяются на две категории: поли-

меры, продуцируемые биологическими системами (например, микроорганизмами) и полимеры, синтезируемые химически, но на основе исходного сырья биологического происхождения (аминокислоты, сахара, жиры) (Angelova, Hunkeler, 1999).

Конструирование биополимеров за последние десять лет превратилось в одно из основных междисциплинарных исследований. Главной целью данного направления работ является: 1) поиск и изучение новых биополимеров; 2) разработка научно-практической базы для конструирования биологических систем, синтезирующих полимеры с заданными свойствами, предназначенные для использования в определенных целях.

Создание экологически чистых материалов с полезными свойствами остается одной из ключевых проблем современности. Особую проблему представляет поиск новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для изготовления хирургических элементов, восстановления поврежденных тканей и конструирования искусственных органов и тканей. Еще более актуален поиск специализированных биосовместимых материалов для сформировавшегося в последние годы нового направления медицинского материаловедения – клеточной и тканевой инженерии, связанного с разработкой биоискусственных органов.

Внедрение новых материалов в медицину выдвигает в число первоочередных проблему биологической совместимости. Создание биосовместимых материалов для имплантатов временного действия, представляет собой более сложную задачу, так как такие материалы и изделия предназначены для восполнения дефектов тканей и органов с последующим замещением биологическими структурами в строго заданные сроки (Пхакадзе, 1990; «Искусственные органы», 1990; Адамян, 1994; «Биосовместимость», 1999; Ratner, 1993; Partnoy, 1998; Amass et al., 1998; Hutmacher, 2001). Потребность в таких материалах остра, и, несмотря на значительные успехи, достигнутые в биоматериаловедении в последние годы, пока не удалось создать субстанции, полностью совместимые с живым организмом. Среди применяемых и активно разрабатываемых в настоящее время биоматериалов – алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот, силикон, полиэтилентерефталат и полиэфиры, синтезируемые микроорганизмами, так называемые полиоксиалканоаты (ПОА) (Платэ, Васильев, 1986; Адамян, 1994; «Биосовместимость», 1999).

Основными факторами, сдерживающими в настоящее время широкое применение биodeградируемых, главным образом, полимерных материалов в медицине, являются в принципе небогатый ассортимент данных материалов, а также пока не решенная проблема

регулируемости и контролируемости процессов их деструкции в живом организме.

Интерес к ПОА растет с конца 80-х годов. Это новый класс биоразрушающихся и биосовместимых полиэфиров, физико-химические свойства которых в зависимости от состава могут существенно варьировать. Полиоксиалканоаты перспективны для применения в пищевой промышленности (упаковочный и антиоксидантный материал), сельском хозяйстве (обволакиватели семян, удобрений, пестицидов, разрушаемые пленки, тара для тепличных хозяйств) и др. сферах, включая медицину и фармакологию.

Сферы применения ПОА в медицине потенциально широки и могут включать изготовление медицинского инструментария и вспомогательных средств (нетканые и одноразовые изделия, шовные и перевязочные материалы), фармакологию (контролируемые системы доставки лекарственных средств), восстановительную хирургию и трансплантологию (Amass et al., 1998; Sudech, Doi, 2000; Stock et al., 2000; Asrar and Graus, 2002). Особо перспективным считается использование ПОА для искусственного перикарда, в качестве сосудистых протезов и биоабсорбируемых покрытий внутрисосудистых стентов (Noisshiki and Komatsuzaki, 1995; Williams, Martin, 2002), матриц для биоискусственных органов (Sodian et al., 2000; Hoerstrup et al., 2000), в частности, для восстановления функциональности миокарда в постинфарктном периоде (Stock et al., 2001), а также для восстановления костной и хрящевой тканей (Türesin et al., 2001; Korkusuz et al., 2001).

На сегодняшний день многие ключевые моменты медицинского материаловедения ПОА остаются открытыми. Это вопросы, связанные с получением высокоочищенных образцов и способами их переработки в медицинские изделия. Противоречивость имеющихся результатов по токсикологическим свойствам более функциональных гетерополимерных ПОА по сравнению с высококристаллическим полиоксибутиратом и фрагментарность данных по кинетике биодеструкции в биологических средах делают эти вопросы первоочередными для исследований.

Нельзя не отметить, что биомедицинские исследования полиоксиалканоатов до последних лет выполнялись исключительно за рубежом с применением препаратов Biopol<sup>®</sup>, DegraPol/btc<sup>®</sup>, производимых известными фирмами. В России целенаправленные медико-биологические исследования ПОА начаты Институтом биофизики СО РАН совместно с НИИТ и ИО МЗ РФ в конце 90-х гг.

# Глава 1. МАТЕРИАЛЫ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

## 1.1. Общие представления о биосовместимых материалах

Исследования в области материалов медицинского назначения являются одним из актуальных направлений на стыке химии высокомолекулярных соединений, физической химии, молекулярной биологии, биофизики и медицины и включают в себя следующие взаимосвязанные задачи:

- изучение механизма взаимодействия биоматериалов с кровью и ее компонентами;
- разработку количественных методов оценки физико-химических и медико-технических свойств биоматериалов и изделий из них;
- разработку новых материалов или методов их модификации;
- экспериментально-клиническое применение материалов и изделий для контакта с кровью.

Материалы медицинского назначения (*синонимы*: биоматериалы, медицинские материалы, биомедицинские материалы) с необходимым комплексом физико-химических и механических свойств, должны быть биосовместимы с тканями организма, кровью и другими биологическими средами. В 1994 г. под термином «биосовместимость» было предложено понимать способность материала, изделий или устройств выполнять свои функции без заметной клинической реакции «хозяина» (Klinkmann and Davison, 1994).

При разработке медицинских изделий используют широкий круг материалов естественного и искусственного происхождения, в том числе, синтетические полимерные, биополимеры, металлы, керамику, гидроксипатиты, углерод, биоткани и гибридные (биоискусственные), основанные на комбинированном использовании биоматериалов и функционирующих клеток различных тканей и органов.

Биосовместимые материалы, предназначенные для контакта с кровью, выделяют в группу гемосовместимых материалов, т. е. материалов совместимых с кровью. Необходимо подчеркнуть, что все гемосовместимые материалы являются биосовместимыми, но не каждый биосовместимый материал можно использовать для контакта с кровью. Так, биосовместимость металлокерамики или сплавов, используемых для изготовления штифтов, ортопедических или стоматологических протезов, не означает, что эти материалы не будут, например, провоцировать изменения клеточного состава крови.

Суммируя существующие представления о характере взаимодействия чужеродного материала с биологическими структурами организма человека (Вильямс, Рауф, 1978; Полимеры медицинского назначения, 1981; Biocompatibility Polymers, Metals, and Composites, 1983; Севастьянов и др., 1987; Пхакадзе, 1990; Искусственные органы, 1990; Биосовместимость, 1999), можно сформулировать основные требования, предъявляемые к биологическим свойствам изделий, предназначенных для контакта с кровью.

Гемосовместимые медицинские изделия не должны:

- оказывать токсического, аллергического и воспалительного действия;
- активировать ферментные системы (свертывающую, фибринолитическую, систему комплемента);
- оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови, а также органы и ткани;
- вызывать антигенный и канцерогенный ответ;
- вызывать отклонения в системе метаболизма;
- провоцировать развитие инфекции;
- нарушать электролитический баланс;
- изменять свои медико-технические свойства в процессе нежелательной кальцификации и (или) биодеградациии.

К характерным и наиболее ярким признакам отсутствия гемосовместимости медицинских изделий относится появление индуцированных их поверхностью тромбов и тромбозмболий. В связи с этим, иногда термин «гемосовместимые» изделия (материалы, покрытия) заменяют на термин «тромборезистентные» («атромбогенные»), а вместо выражения «не гемосовместимые» изделия, используют термин «тромбогенные», что не является корректной заменой. В последующих главах будет показано, что не существует строгого соответствия между характером реакций различных компонентов крови на инородное тело. При отсутствии, например, признаков активации свертывающей системы крови (свойство тромборезистентной (атромбогенной) поверхности), могут наблюдаться активация системы комплемента или реакция нейтрофилов. Следовательно, тромборезистентность является только одним из признаков гемосовместимости изделия, контактирующего с кровью, который определяется характером его взаимодействия с организмом человека на молекулярном, клеточном и системном уровнях.

Биосовместимость медицинских изделий зависит от ряда факторов: физико-химических свойств входящих в их состав материалов, конструкции и технологии изготовления и условий функционирования изделий, состояния пациента. Тем не менее, в реальной ситуации медико-биологические свойства конкретного изделия будут

Таблица 1.1

**Возможные эффекты взаимодействия полимерных материалов с биологическими средами (Севастьянов, 1990; Биосовместимость, 1999)**

| Характер взаимодействия  | Эффект   |
|--|--|
| <i>Кратковременный контакт с кровью и тканями (от минут до нескольких часов)</i> | Набухание<br>Адсорбция ионов и белков<br>Адгезия и разрушение клеточных элементов крови<br>Активация факторов свертывания<br>Локальные тромбозы<br>Инициирование местной воспалительной реакции<br>Инициирование активации системы комплемента<br>Инициирование фибринолиза<br>Инициирование эмболизации |
| <i>Продолжительный контакт с кровью и тканями (от нескольких часов до дней)</i>  | Изменения в характере адсорбции белков<br>Усиление реакции клеточных компонентов крови<br>Развитие процессов коагуляции<br>Развитие фибринолиза<br>Развитие хронической воспалительной реакции<br>Развитие процессов эмболизации   |
| <i>Длительный контакт с кровью и тканями (месяцы, годы)</i>                      | Эмболизация<br>Кальцификация<br>Канцерогенез<br>Биодеградация<br>Капсуляция фиброзной тканью, рост паннуса   |

определяться в основном характером взаимодействия биоматериалов с тканями и кровью.

Следует подчеркнуть, что степень взаимного воздействия конкретного биоматериала и крови зависит от времени функционирования изделия (таблица 1.1). Поэтому при исследовании физико-химических и биологических свойств материала, предназначенного для изготовления того или иного устройства, необходимо учитывать сроки его эксплуатации.

## **1.2. Основные подходы к созданию биосовместимых материалов**

Значительные успехи, достигнутые в фундаментальных и прикладных областях биоматериаловедения – междисциплинарной науке о материалах, используемых в биологии и медицине, стимулировали разработку и клиническое применение различных изделий, систем и устройств медицинского назначения. Вместе с тем, несмотря на проводимые в течение последних 30 лет исследования, пока еще не удалось создать искусственный материал, полностью совместимый с живым организмом.

Тем не менее, удалось достичь существенных успехов в области разработок новых биоматериалов и методов модификаций; экст-

ракорпоральных устройств и имплантируемых искусственных органов. Это позволило улучшить или спасти жизнь миллионов людей.

Так, в 2001 г. в мире ежедневно проводили около 3000 операций с применением аппаратов искусственного кровообращения, и было продано более 250 млн. различных имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии. Всего в различных странах в 2001 г. было проведено не менее 400 000 имплантаций клапанов сердца, 1500 искусственных желудочков сердца (ИЖС), 600 000 протезов кровеносных сосудов малого диаметра. Наибольший рост числа имплантаций в ближайшие годы (от 40 и более %) ожидается для ИЖС, в основном, как промежуточного этапа пересадки сердца.

В таблице 1.2 приведен перечень основных подходов к созданию медицинских материалов, основанных на существующих представлениях и гипотезах о механизме взаимодействия чужеродной поверхности с кровью и тканями организма (Sevastianov, 1991; Биосовместимость, 1999).

Заметим, что обширный перечень методов для повышения медико-технических свойств материалов и изделий не столько свидетельствует в пользу решения проблемы их биосовместимости, сколько подчеркивает основные трудности, возникающие на пути моделирования структуры и функций естественных тканей и органов.

**Таблица 1.2**

**Основные подходы к созданию материалов медицинского назначения (Sevastianov, 1991; Биосовместимость, 1999)**

| Наименование подходов   | Способы реализации   |
|---|--|
| <p>Разработка новых биосовместимых материалов искусственного или природного происхождения</p> <p>Физическая и (или) химическая модификация поверхности или объема изделия</p> <p>Регулирование биосовместимых свойств изделия на стадии его изготовления.</p> | <p>Блоксополимеры с гидрофильными и гидрофобными доменами; интеллектуальные материалы, включая гидрогели; гибридные (биоискусственные) материалы; биополимеры, в том числе, бактериальные</p> <p>Различного вида обработка тлеющим плазменным разрядом (магнитоактивное СВЧ-плазменное осаждение в импульсном и непрерывном режиме, плазмохимическое осаждение, низкотемпературная плазма ВЧ-разряда при пониженном давлении, ионно-плазменное напыление); газофазное осаждение; УФ-обработка; термообработка</p> <p>Поверхностная иммобилизация биологически-активных веществ (БАВ) и функциональных групп (физическая, ионно-ковалентная, ковалентная)</p> <p>Диспергирование БАВ в объеме материала.</p> <p>Варьирование технологических параметров (химическая чистота исходного сырья, материал пресс-формы, природа растворителя, температура переработки и т. д.)</p> |

### 1.3. Области применения искусственных материалов

С каждым годом расширяется номенклатура биоматериалов в различных областях практического здравоохранения. Кратко рассмотрим ряд примеров использования биоматериалов в изделиях медицинского назначения.

#### 1.3.1. Материалы для сердечно-сосудистой хирургии

Наиболее большую группу материалов медицинского назначения представляют собой материалы для сердечно-сосудистой хирургии (таблица 1.3).

Таблица 1.3

**Биомедицинские материалы для сердечно-сосудистой хирургии и область их применения (Senatore, 1988; Биосовместимость, 1999)**

| Наименование материала                      | Применение   |
|---|--|
| <i>Синтетические биостабильные</i>          |  |
| Акрилаты                                    | Конструкционные материалы для экстракорпоральных устройств     |
| Эпоксисоединения                            | Клапаны сердца и элементы искусственного сердца                |
| Фторуглероды                                | Протезы кровеносных сосудов, покрытия катетеров                |
| Гидрогели                                   | Покрытия катетеров   |
| Полиацеталь                                 | Элементы искусственного сердца                                 |
| Полиамиды                                   | Шовные нити  |
| Поликарбонаты                               | Конструкционные материалы для экстракорпоральных устройств     |
| Полиэфирсы                                  | Протезы кровеносных сосудов, баллоны для реконструкции сосудов |
| Полиэфиркетоны                              | Клапаны сердца и элементы искусственного сердца                |
| Полиимиды                                   | Клапаны сердца и элементы искусственного сердца                |
| Полиолефины                                 | Шовные нити  |
| Полиолефиновые эластомеры                   | Трубки, искусственное сердце                                   |
| Высококристаллические полиолефиновые пленки | Баллоны для реконструкции сосудов                              |
| Полисульфоны                                | Клапаны сердца и элементы искусственного сердца                |
| Полиуретаны                                 | Катетеры, искусственное сердце                                 |
| Поливинилхлорид                             | Трубки, емкости для крови                                      |
| Силиконы                                    | Трубки, шариковые клапаны сердца                               |
| <i>Биодеградируемые</i>                     |  |
| Полиаминокислоты                            | Контролируемое высвобождение, пептиды для адгезии клеток       |
| Полиангидриды                               | Контролируемое высвобождение                                   |
| Поликапролактаны                            | Контролируемое высвобождение                                   |
| Сополимеры лактидов и гликолидов            | Контролируемое высвобождение, шовные нити                      |



|  |   |
|--|---|
| Полигидрооксибутираты  | Контролируемое высвобождение  |
| Полиортоэфир   | Контролируемое высвобождение  |
| <i>Материалы из биотканей</i>  |   |
| Бычья артерия и вены   | Протезы кровеносных сосудов   |
| Бычий перикард   | Заменитель перикарда, клапаны сердца  |
| Пупочная вена человека   | Протезы кровеносных сосудов   |
| Клапаны свиньи   | Клапаны сердца  |
| <i>Материалы из биополимеров</i>   |   |
| Сшитый альбумин  | Покрyтия для сосудистых протезов, контрастный агент для ультразвуковой диагностики  |
| Ацетат и гидрат целлюлозы  | Мембраны для гемодиализа  |
| Хитозаны   | Покрyтия, контролируемое высвобождение  |
| Коллаген, эластин, гиалуроновая кислота, желатин   | Покрyтия  |
| Фосфолипиды  | Липосомы, покрyтия  |
| Шелк   | Шовные нити, покрyтия шелкоподобных белков  |
| <i>Пассивирующие покрyтия</i>  |   |
| Альбумин, алкильные цепочки  | Увеличение тромборезистентности   |
| Фторуглероды, гидрогели  | Уменьшение шероховатости поверхности катетеров  |
| Силиконы, свободные от кремния   | Увеличение тромборезистентности   |
| Силиконовые масла  | Смазка для игл и катетеров  |
| <i>Биоактивные покрyтия</i>  |   |
| Антикоагулянты (гепарин, гирудин и др.)  | Увеличение тромборезистентности   |
| Бактерициды  | Ингибирование инфекции  |
| Адгезивные белки и пептиды клеток  | Увеличение адгезии клеток, эндотелия  |
| Полимеризованные покрyтия в тлеющем разряде  | Увеличение адгезии тромбоцитов  |
| Тромболитики   | Увеличение тромборезистентности   |
| <i>Клеи</i>  |   |
| Цианакрилаты   | Склеивание мелких сосудов   |
| Фибриновый   | Покрyтие протезов кровеносных сосудов   |
| Клей моллюсков   | Увеличение адгезии клеток   |
| <i>Металлы и сплавы</i>  |   |
| Сплавы хромированного кобальта   | Проволочные проводники, мандрены, электроды   |
| Сплавы хромированного никеля<br>Сплавы с памятью формы<br>Нержавеющая сталь<br>Тантал<br>Сплавы тантала и титана<br>Сплавы титана и никеля | Электрокардиостимуляторы, седла клапанов, зонты-ловушки для тромбов, коннекторы для искусственного сердца, каркасы для биоклапанов и кровеносных сосудов.<br>Стенты |

|   |   |
|---|---|
| <i>Керамика, неорганика, кремнеземы</i>   |   |
| Монокристалл окиси алюминия (сапфир)  | Клапаны сердца, интраокулярные линзы                              |
| Пористая окись алюминия   | Образователь пузырей в пузырьковом оксигенаторе                   |
| <i>Углеродистые материалы</i>   |   |
| Пиролитический углерод (низкотемпературный и ультра-низкотемпературный изотропный)                  | Клапаны сердца, покрытия  |
| <i>Композитные материалы</i>  |   |
| Карбоновые волокна на основе матрицы из эпокси соединений, полиэфиркетонов, полиимида, полисульфона | Для колец, дисков и каркасов                                      |
| Рентгеноконтрастные добавки ( $BaSO_4$ , $BaCl_2$ , $TiO_2$ ) в полиолефины, полиуретаны, силиконы  | Для идентификации локализации изделий, устройств и приспособлений |

Области их применения достаточно широки, – это многосерийное производство изделий (например, мешков для хранения крови, игл и шприцев), изготовление изделий с более жесткими требованиями к гемосовместимости (например, внутрисосудистые катетеры), создание высокотехнологичных и требующих наукоемких исследований имплантируемых изделий малых серий (протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения и т. п.).

### **1.3.2. Материалы для протезов кровеносных сосудов**

К гемосовместимым материалам, предназначенным для изготовления протезов кровеносных сосудов, особенно вен или артерий малого диаметра, предъявляются наиболее жесткие требования (Soldani, 1991; Tomizava, 1995). Гемосовместимость сосудистых протезов зависит не только от природы используемого материала и технологии изготовления протеза, но и от целого ряда таких факторов, как:

- конструкция и диаметр протеза;
- условия гемодинамики в области имплантации протеза;
- состояние пациента и характер процесса заживления раны после операции;
- вид анастомозов и тактики антитромбогенной терапии;
- физико-механические свойства, в частности, порозность и деформируемость в радиальном и продольном направлениях;
- развитие инфекции и других послеоперационных осложнений.

Тем не менее, реальной возможностью улучшения медико-биологических свойств сосудистых протезов является поиск материалов с улучшенными гемосовместимыми свойствами.

Исходя из типа материала природного или синтетического происхождения, современные коммерческие или лабораторные сосудистые протезы можно разбить на несколько групп, каждая из которых имеет свои недостатки и достоинства (Senatore, 1988; Биосовместимость, 1999):

- 1) рассасывающиеся и биodeградируемые протезы из полилактина 910, смеси полиуретана и поли-L-лактида,
- 2) ксенопротезы на основе кровеносных сосудов крупного рогатого скота,
- 3) аллопротезы из бедренных вен,
- 4) полиэтилентетрафталатные (Dacron) протезы,
- 5) политетрафторэтиленовые (Teflon) протезы, включая фибриллярные политетрафторэтиленовые (Gore-Tex) протезы,
- 6) эластичные протезы из полиуретановых и дакроновых (тефлоновых) нитей,
- 7) тканые протезы из полиэтилентетрафталата с обработкой внутренней поверхности тетрафторэтиленом в режиме тлеющего плазменного разряда,
- 8) тканые велюровые протезы на основе полиэтилентетрафталата с полипропиленовой оболочкой,
- 9) протезы из композитных материалов на основе материала естественных кровеносных сосудов и дакроновых (тефлоновых) волокон,
- 10) протезы из коллагенсодержащих материалов,
- 11) биопротезы из пупочной вены человека,
- 12) дакроновые (тефлоновые) протезы, модифицированные гемосовместимыми гидрофобно-гидрофильными и (или) гепаринсодержащими полимерными покрытиями,
- 13) гибридные сосудистые протезы на основе смесей синтетического материала (полиуретан, полиакриламид, полиакриловая кислота, поливиниловый спирт) с фибрином или коллагеном.

Из синтетических протезов наибольшее распространение в клинической практике в последние 15 лет получили сосудистые протезы на основе политетрафторэтилена (ПТФЭ) (Биосовместимость, 1999). ПТФЭ – один из наиболее химически инертных полимерных материалов. При имплантации протезы из ПТФЭ вызывают минимальную реакцию окружающих тканей, а сам материал не изменяет свои медико-биологические и физико-химические свойства. К отрицательным свойствам неармированных протезов из ПТФЭ следует отнести возможность развития аневризмы в аортальной позиции.

Одной из основных проблем остается отсутствие функционально надежных сосудистых протезов из синтетических материалов малого диаметра (не более 4.0 мм), необходимых для аортокоронарного шунтирования. Заметим, что все известные попытки создания сосудистых протезов малого диаметра основаны на поиске гемосовместимых биологических, синтетических или гибридных покрытий, обеспечивающих минимальную реакцию модифицированной внутренней поверхности протеза с кровью, а внешней – с тканями организма.

### **1.3.3. Синтетические биodeградируемые материалы**

Биodeградируемыми биосовместимыми материалами называются материалы, способные разрушаться после определенного времени имплантации с образованием нетоксичных продуктов, которые выводятся организмом или усваиваются им. Наиболее перспективными областями применения таких материалов в медицине являются: биodeградируемые шовные нити, матрица для доставки лекарств в определенные участки организма, сердечно-сосудистые, стоматологические и ортопедические хирургические временные крепежные элементы (Липатова и Пхакадзе, 1983; Пхакадзе, 1990; Degradable Materials, 1990; Биосовместимость, 1999; Amass et al., 1999).

В таблице 1.4 перечислены современные биоабсорбируемые материалы, главным образом, на основе лактидов, гликолидов и их сополимеров, выпускаемые рядом зарубежных фирм. Основным фактором, сдерживающим клиническое применение новых биodeградируемых материалов, является проблема регулируемости и контролируемости процессов их биодеструкции в реальных условиях организма. Наиболее изученными в этом плане являются полиуретаны. Было показано, что деструкция медицинского полиуретанового клея КЛ-3 в организме происходит, как по пути неферментативного гидролиза, так и клеточным путем (Пхакадзе Г. А., 1990). При этом резорбция полимерного материала протекает клеточным путем и связана, в основном, с двумя типами клеток – макрофагами, осуществляющими фагоцитоз мельчайших частиц полимера, и гигантскими клетками инородных тел, вызывающими его лизис. «Доля» клеточного компонента биодеструкции обычно тем более выражена, чем больше развита поверхность полимера, например, у перистогубчатых имплантатов, или на поздних этапах деструкции полимеров, когда поверхность имплантата увеличивается за счет эрозии. Эта закономерность сохраняется и для полиуретанов тривиального состава, как правило, подвергающихся неферментативному гидролизу, и для полиуретанов со «слабыми звеньями» (сложные эфирные группы, полисахаридные звенья), способных подвергаться ферментативному расщеплению (Пхакадзе Г. А., 1990).

Таблица 1.4

**Перечень, состав и область применения биоабсорбируемых материалов  
(Биосовместимость, 1999)**

| Наименование, материал   | Область применения, фирма-производитель  |
|--|--|
| Absolock, полидиоксанон  | Сшивающая скобка для кровеносных сосудов, Ethicon, Inc., США   |
| Alzamer, полиортоэфир  | Матрица для доставки (бывш. Chronomer) лекарственных веществ, Alza, Inc., США                              |
| BAR  | Частично биоабсорбируемое анастомозное кольцо для кровеносных сосудов, BAR, США                            |
| Biodel, поли(бис(п-карбоксивенокси пропан ангидрид) себациновой кислоты) | Матрица для доставки лекарственных веществ, Nova Pharmaceutical, Inc., США                                 |
| Biofix, полидиоксанон, армированный полигликолидом                       | Штифт для фиксации фрагментов кости, Bioscience, Ltd., Tampere, Финляндия                                  |
| Carponor, поликапролактон  | Матрица для контрацептивного (стероидный) имплантата, Research Triangle Institute, Inc., США               |
| Дехон, полигликолид  | Плетенные хирургические нити American Cyanamid Co., Inc., США  |
| Drylac, поли-L-лактид  | Пористая повязка для оральной хирургии   |
| Ethipin, полидиоксанон   | Штифт для фиксации костно-хрящевых фрагментов, Ethicon, Inc., США  |
| Lactomer, сополимер поли-(L-лактид – 30 %-гликолид)                      | Сшивающие сосуд скобки, U.S. Surgical Corp., Inc., США   |
| Orthosorb, полилактид  | Ориентированные материалы для восстановительной ортопедии, Johnson & Johnson, Inc., США                    |
| Полидиоксанон  | Хирургическая шовная мононить, Ethicon Inc., США   |
| Valtrac, полигликолид и сульфат бария.                                   | Частично биodeградируемое анастомозное кольцо для абдоминальной хирургии, American Cyanamid Co., Inc., США |
| Vicryl, сополимер поли(гликолид-10 %-L-лактид), или полиглактин 910      | Плетенные хирургические нити Ethicon, Inc., США  |

В свете этого особое внимание уделяется разработке методов прогнозирования времени жизни имплантатов из биodeградируемых материалов с полностью охарактеризованными физико-химическими и физико-механическими свойствами, состоящей, в основном, из тестов трех уровней отбора (Stokes., 1993):

- ускоренные испытания *in vitro*;
- оценка биостабильности *in vivo*;
- клинические испытания.

Одной из главных причин осложнений при использовании биodeградируемых материалов является воспалительная и аллергическая реакция организма на продукты деструкции материала (Anderson, 1993), проявление канцерогенности (James, 1997). Это необходимо учитывать при определении сроков тестирования биodeградируемых имплантатов.

В последние 15 лет непрерывно растет интерес к бактериальным полиэфирам (полигидроксиалканотам, ПОА) – биodeградируе-

мым материалам природного происхождения (Biomedical Polymers, 1994; Севастьянов, 2001). К наиболее изученным ПОА относятся поли(3-гидроксибутират, ПОБ) и сополимеры 3-оксибутирата с 3-оксивалератом, ПОБ-со-ПОВ. Полиоксибутират – гомополимер, синтезируемый различными видами прокариотидных клеток в специфических условиях роста, он является субстратом эндогенного дыхания и поддерживает жизнеспособность клеток в неоптимальных условиях среды. ПОБ образован мономерами β-оксимасляной кислоты, являющейся продуктом обмена веществ у высокоорганизованных организмов и одним из компонентов крови человека. Физико-химические, механические, технологические свойства сополимеров оксибутирата с оксивалератом делают их весьма привлекательными для разработки шовных материалов, мембран, временных каркасов для гибридных органов, систем для пролонгированного введения лекарственных веществ (Биосовместимость, 1999; Amass et al., 1998; More and Sauders, 1998; Sudesh et al., 2000).

#### **1.3.4. Материалы для ортопедии и стоматологии**

Современные биodeградируемые и биостабильные материалы, применяемые или разрабатываемые в ортопедии и стоматологии, относятся к шести основным группам (Handbook of Bioactive Ceramics, 1990; Osseo-integrated implants, basics, materials, and joint replacements, 1990; A Comprehensive Guide to Medical/Pharmaceutical Applications, 1991; Применение плазменного напыления в производстве имплантатов для стоматологии, 1993). Среди них:

Биоактивная керамика:

- биоактивное стекло,
- керамика из гидроксиапатитов,
- биоактивная стеклокерамика,
- биоактивные композиты (трикальций фосфаты, кальций фосфаты, гидроксиапатиты);

Стоматологические цементы:

- акрилатные,
- гидроксиапатитные с полилактидом,
- алюмосиликатные;

Металлы и их сплавы

- медь (76–87 % Cu, 6–11 % Al, 0–12 % Zn, 1–5 % Ni, 0–4 % Fe, 0.5–1.2 % Mn),
- нержавеющая сталь,
- титан,
- сплавы титана,

Композиты металлов с керамикой:

- никель-титановые,
- кобальт-хром-молибденовые,

- титан с керамическим покрытием,
- титан с керамическим и с фосфат кальциевым покрытием,
- сплавы титана с керамическим покрытием,
- титан со стеклокерамическим покрытием,
- кальций-фосфат титана;

Полимерные материалы:

- полиметилметакрилат (ПММА),
- полифосфорэфиры,
- полилактид,
- силикон,
- полиэтилен;

Наполнители:

- стекло в виде пудры,
- микро- и макропористые гели,
- частицы титана со стеклокерамикой.

Следует отметить, что ткани наиболее толерантны к титану, поэтому он, наряду с кобальт-хромовыми сплавами, часто используется в ортопедической и стоматологической практике при изготовлении имплантатов. Защитная функция титана обусловлена пассивированным слоем окиси титана ( $TiO_2$ ,  $TiO$ ,  $Ti_2O_3$ ,  $Ti_3O_4$ ), который на воздухе за несколько минут достигает толщины от 2 до 10 нм. Весьма перспективным является использование изделий из порошков легированного и нелегированного титана. Сплавы титана применяют в ортопедической стоматологии для изготовления вкладок, штифтовых конструкций, коронок, базисов съемных протезов.

Тем не менее, остается недостаточно изученным вопрос о влиянии титана на костно-мозговые остеогенные клетки (предшественники фибробластов) и их пролиферативную активность, которая, как правило, резко возрастает при имплантации и трансплантации.

Для стоматологических имплантатов наиболее часто привлекают ПММА, цельный и пористый. При изготовлении съемных протезов челюсти используют пять базисных полимерных материалов (сополимер поливинилацетат-полиэтилен, или этилен-винилацетат, поливинилхлорид, натуральный каучук, полиуретан, акрил), но предпочтение отдается сополимеру, который обладает лучшими физико-механическими свойствами.

Полимерные материалы применяют также в качестве покрытий поверхности титановых и металлокерамических изделий. Тем не менее, основной недостаток имплантатов, включающих в свой состав полимерные материалы, состоит в том, что по мере старения полимера проявляются реакции отторжения, раздражение мягких тканей и аллергические реакции (Anderson, 1993).

Важнейшими отличительными характеристиками керамических материалов (корундовая керамика, сапфир, углеродные и стеклоуг-

леродные соединения, алюмооксидная керамика и др.) являются высокой коррозионной стойкостью, хорошей совместимостью с тканями (Костюков, 1985; Седунов, 1988; Применение плазменного напыления в производстве имплантатов для стоматологии, 1993). Однако следует отметить сложность технологии изготовления имплантатов из керамики, поэтому до сих пор керамика не нашла широкого применения.

Весьма перспективными материалами являются композиционные системы ситаллы (стеклокерамика), основой кристаллической фазы которых являются сподумен и дискалит лития (Седунов, 1988). Серьезным недостатком биологического стекла и стеклокерамики является невысокая механическая прочность и заметная деструкция в тканях организма. Стеклокерамика в настоящее время используется лишь в качестве покрытия имплантатов.

Одна из основных проблем в ортопедической и стоматологической хирургии – существующая разница в жесткости естественной костной ткани и металлических и керамических имплантатов, широко используемых в настоящее время (последние, по крайней мере, в 10–40 раз жестче при заданной прочности). На практике при изготовлении суставов, челюстей, стоматологических и ортопедических штифтов широкое применение нашли конструкции имплантатов сложной структуры. Они, как правило, состоят из основы (титан или нержавеющие стали), системы переходного слоя (например, порошок титана) и тонкого биокерамического слоя (гидроксиапатит, трикальций фосфат, стеклокерамика с активной компонентой и др.).

Формирование на поверхности имплантата тонкого биологически активного слоя с определенной пористой структурой и морфологией поверхности, с необходимыми адгезионно-когезионными и другими свойствами является сложной задачей. Наиболее перспективной представляется технология плазменного напыления порошковых материалов (Применение плазменного напыления в производстве имплантатов для стоматологии, 1993). При введении в костную ткань таких имплантатов происходит эффективное прорастание кости в поры покрытия. В процессе заживления наблюдается интеграция пористопорошкового тонкого слоя напыленной гидроксиапатитовой керамики в собственную костную ткань. Это обеспечивает прочное и длительное закрепление имплантата и нормальное его функционирование в организме.

Сравнительно недавно была выдвинута идея использования композитных материалов для изготовления имплантатов, варьируя состав которых можно добиться высокой прочности в сочетании с низкой жесткостью. Кроме того, изделия из композитных материалов устойчивы к циклическим нагрузкам, легко адаптируемы к механическим воздействиям и могут иметь разную прочность в необхо-



димых направлениях. Среди таких композитных материалов наиболее перспективны следующие:

- композиты на основе коллагена, желатины, фибрина или полимерных материалов (полисульфоны, силиконы, полифосфазены) с диспергированием в объеме матрицы до 20–30 вес. % биоактивной керамики (стекло, гидроксиапатиты, стеклокерамика, трикальцийфосфат, фосфаты кальция);
- углеродсодержащие композиты: углерод, армированный углеродными волокнами; полисульфон, армированный углеродными волокнами; резины, армированные углеродными волокнами. Обычно, углеродные волокна получают пиролизом таких органических волокон, как полиакрилонитрил или искусственный шелк.
- органоапатиты.

### **1.3.5. Сорбенты**

Сорбенты, применяемые для лечения широкого круга заболеваний, по способу использования делятся на две основные группы (Николаев, Горчаков, 1989):

- сорбенты для гемоперфузии,
- сорбенты перорального применения (эндосорбенты)

По функциональной активности в каждой группе можно выделить сорбенты неспецифического и биоспецифического (селективного) действия. Первое место среди неспецифических сорбентов занимает активированный уголь. Уголь также может быть иммобилизован или включен в матрицу из полимерных материалов, представляющих собой полые волокна, гидрогели и др.

Кроме угольных, в качестве неспецифических сорбентов, можно применять природные и синтетические неорганические ионообменники (фосфаты, целлюлоза, белки, шерсть, гумус, глинозем, силикаты, магнезия, смолы, лигнин, клетки тканей и крови и т. д.).

Клиническое применение ионообменных смол пока ограничивается лечением гиперкалиемии, гиперкальциемии, гиперфосфатаемии, связыванием желчных кислот и регенерацией диализата. Более широко в клинике используются незаряженные формы смол типа Amberlite XAD, XAD-2, XAD-4, XAD-7 в гемоперфузионных колонках для очистки крови от токсикологических (лекарственных) отравлений и при острой печеночной недостаточности.

С недавних пор альтернативой гранулярным угольным сорбентам являются угольные сорбенты в виде волокон, тканые и стекловидные угольные сорбенты. Все перечисленные формы угольных сорбентов служат матрицей для иммобилизации различных биологически активных лигандов с целью создания биоспецифических сорбентов (Nikolaev, 1990; Биосовместимость, 1999).

Помимо углеродной матрицы, для биоспецифических сорбентов используют нейлон, агарозу, полиакриламидные гели, пористое стекло, целлюлозу, сефадексы и др., а для создания биоспецифичных групп – различные биологические молекулы (белки, аминокислоты, сахара, нуклеотиды, стероиды и др. Особое место среди них занимают недавно разработанные иммуноплазмсорбенты для лечения онкологических больных; гемоиммуносорбенты, оказывающие положительное действие при демиелинизирующих заболеваниях и псориазе; специфические ферментсодержащие энтеросорбенты для лечения дисфункций поджелудочной железы и ряда других заболеваний органов пищеварения, а также для лечения пищевой аллергии (Lorukhin, 1990; Михалковский, 1987). Введение в углеродную матрицу модифицирующих агентов позволило создать аппликационные сорбенты, обладающие помимо неспецифической сорбционной, также специфической функциональной активностью, необходимой на отдельных стадиях раневого процесса (гемостатической, бактерицидной, некролитической, гигроскопической, репаративной) (Nikolaev, 1992).

Перспективным представляется использование биоспецифических сорбентов, например, гепарин-агарозовых гелей, для регулирования уровня липидов низкой плотности и холестерина в крови (Pokrovsky, 1990).

### **1.3.6. «Интеллектуальные» материалы и биоматериалы для гибридных (биоискусственных) органов и тканей**

Следует признать, что результаты многолетней работы ученых пока не привели к созданию искусственной биосовместимой поверхности, аналогичной по своим свойствам, например, интима кровеносных сосудов. Исследователи далеки от создания искусственных органов на основе только синтетических материалов с заданными и контролируруемыми свойствами.

Последние 15 лет наблюдается интенсивный рост исследований, связанных с разработкой биомедицинских материалов, способных имитировать те или иные свойства биологических структур (Heuer, 1992; Ratner, 1993; Hoffman, 1995; Anderson, 1996). Данное направление получило название биоимитирование, а соответствующие материалы стали называть «саморегулируемыми» (self-monitoring), «умными» (smart) или «интеллигентными» (intelligent).

Эти термины относятся к полимерным покрытиям или системам, которые способны менять свои свойства при небольших физических или химических воздействиях внешней среды (рН, температуры, концентрации химических или биохимических веществ, при механических нагрузках, воздействии электромагнитного поля, радиации и др.).

Область применения таких материалов достаточно широка:

- трансдермальные или имплантируемые устройства с контролируемым и регулируемым выходом биологически активных веществ для лекарственной, клеточной и генной терапии;
- изделия с «памятью формы» для ортопедии и сердечно-сосудистой хирургии;
- биodeградируемые изделия;
- биосенсоры,
- различные биотехнологические способы сепарации, очистки и идентификации биологических структур на молекулярном и клеточном уровнях и т. д.

В настоящее время можно выделить следующие химические и биотехнологические подходы к созданию саморегулируемых материалов и покрытий:

- синтез материалов, содержащих, в ряде случаев в своей структуре биологически активные молекулы, способные заметно менять свои свойства при небольших физических или химических воздействиях внешней среды;
- разработка материалов с использованием методов клеточной биологии и генной инженерии, так называемых гибридных (биоискусственных) систем, состоящих из биоматериалов и нативных биологических структур (например, биологически активных молекул, факторов роста клеток, белков плазмы крови, клеток различных органов и тканей);
- разработка материалов, поверхность которых способна к биоспецифическим реакциям с физиологически активными молекулами или клетками непосредственно при контакте с кровью или тканями в организме человека;
- разработка материалов на основе биотканей человека и животных, обработанных консервантами, среди которых наиболее распространены глутаровый альдегид и эпоксисоединения;
- разработка биodeградируемых композитных материалов с контролируемым и регулируемым временем биodeградации, в том числе, полимеров, продуцируемых бактериями.

Анализ новейших работ в области трансплантологии и искусственных органов дает основание говорить о появлении принципиально нового подхода к восстановлению функций жизненно важных органов – использование технологий генной, клеточной и тканевой инженерии (Севастьянов, 1997; Bioartificial Organs, 1997; Naughton, 1998; Bioartificial Organs II., 1999; Bioartificial Organs III, 2001). Проводимые исследования можно разделить на две группы: разработка биоискусственных (гибридных) органов и тканей, клонирование органов и тканей из собственных стволовых клеток пациента *in vitro* в специальных биореакторах.

В настоящее время основной акцент сделан на поиске технологий для создания биоискусственных материалов и органов, представляющих собой систему из полимерных материалов и функционирующих клеток органов и тканей. Конструирование временных биodeградируемых каркасов (матриков) для гибридных органов представляет собой сложную задачу. Особенности биоискусственных материалов и изделий является контролируемое время их биорезорбции в организме с постепенным замещением в строго заданные сроки нативными клетками и тканью того или иного органа.

Гибридные (биоискусственные) системы должны сочетать в себе свойства живой и неживой ткани таким образом, чтобы, при необходимости полностью или частично, временно или постоянно заменить функции тех или иных утраченных естественных органов. Наиболее известными примерами практического применения гибридных органов являются замещения функций поджелудочной железы, печени, пищевода, кровеносных сосудов и др. (таблица 1.5).

Для разрабатываемых в настоящее время биоискусственных органов наиболее перспективны биополимеры – хитозаны, коллагены, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), полимеры оксипроизводных жирных кислот – полиоксисалканоаты (ПОА), композитные материалы на основе гидроксиапатитов и др. (Севастьянов, 1997; Naughton, 1998; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001).

Таблица 1.5

Примеры биоискусственных (гибридных) органов и систем

| Гибридный орган                          | Биологическая компонента    | Синтетическая компонента                                      |
|--|-----------------------------|---|
| Искусственная поджелудочная железа       | Островковые клетки          | Полимерная капсула  |
| Искусственная печень                     | Гепатоциты                  | Полимерная капсула  |
| Искусственный пищевод                    | Клетки слизистой ткани      | Силиконовая трубка  |
| Искусственный протез кровеносного сосуда | Эндотелиальные клетки       | Пористый политетрафторэтилен<br>Ксенопротез из бычьих артерий |
| Искусственный нейрон                     | Нейроны                     | Проводники  |
| Искусственный хрящ                       | Хондроциты                  | Полимерная основа   |
| Искусственные эритроциты                 | Гемоглобин                  | Полимерная капсула  |
| Имобилизованные ферменты                 | Ферменты                    | Полимерная основа   |
| Искусственный желчный пузырь             | <i>Pseudomonas pictorum</i> | Полимерная капсула  |
| Лечение болезни Паркинсона               | Нейросекреторные клетки     | Полимерная капсула  |

Одной из ключевых проблем создания биоискусственных органов и тканей является разработка биodeградируемых двухмерных (пленочных) и трехмерных (губки) матриц для клеток (Севастьянов, 1997; Bioartificial Organs, 1997; Naughton, 1998; Bioartificial Organs III, 2001; Liao et al., 2002; Li et al., 2002; Borden et al., 2002; Hua et al., 2002; Lin et al., 2002; Ganta et al., 2003; Sato et al., 2003; Wang et al., 2003; Ma et al., 2003; Karp et al., 2003; Hu et al., 2003).

Матрицы для биоискусственных органов должны иметь следующие свойства:

- многофункциональность (одновременно выполняют функции каркаса, подложки и питательной среды для клеточных культур),
- механическую прочность и эластичность, достаточную для хирургических манипуляций,
- биосовместимость на белковом и клеточном уровне, как готового изделия, так и продуктов его биodeградации,
- способность стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток,
- регулируемое время биodeградации, от нескольких месяцев до 1–2 лет,
- способность к неоваскуляризации,
- возможность стерилизации без изменения медико-технических свойств.

Приоритетной областью применения разработанных биodeградируемых композиций является использование данных материалов для культивирования стволовых клеток с последующей их дифференциацией в кардиомиоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки с целью создания биоискусственных покрытий для искусственного сердца, кровеносных сосудов и кожи, для клеточной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы. Другие области применения: нейрохирургия, ортопедия, биоискусственная печень и поджелудочная железа.

В настоящее время не существует промышленно выпускаемых матриц для биоискусственных органов и тканей. Практически все известные по открытой печати зарубежные разработки (Neurogel<sup>TM</sup>, Matrigel<sup>®</sup>, DegraPol/btc<sup>®</sup>, PHA- Metabolix) находятся на стадии доклинических испытаний. Исключением является гидрогелевая матрица Neurogel<sup>TM</sup>, допущенная к клиническим исследованиям и предназначенная для восстановления нервной ткани (U.S. Patent 5,863,551, 1999; Organogel Canada LTEE).

Рассмотрим несколько примеров экспериментального использования биоматериалов в качестве матриц для биоискусственных органов.

## Гибридные протезы кровеносных сосудов малого диаметра

Одной из основных проблем в современной сердечно-сосудистой хирургии остается отсутствие функционально надежных сосудистых протезов малого диаметра (не более 5 мм), необходимых для аортокоронарного шунтирования при ишемических болезнях сердца и для протезирования малых артерий (вен) при заболеваниях периферической сосудистой системы. Примерно у 20 из 1000 человек старше 65 лет ежегодно выявляют то или иное заболевание кровеносных сосудов.

Ежегодная мировая потребность в протезах малого диаметра только для аортокоронарного шунтирования составляет около 450 000 шт., что составляет ~69,5 % от всех протезов кровеносных сосудов.

Все подходы к созданию сосудистых протезов малого диаметра можно разделить на три группы:

- разработка композиционных полимерных материалов с повышенными гемосовместимыми и биомеханическими свойствами;
- разработка для модификации существующих протезов гемосовместимых синтетических покрытий, имитирующих интиму естественных сосудов;
- предварительное культивирование *in vitro* методами тканевой (в отечественной литературе – клеточной) инженерии эндотелиальных клеток на синтетической поверхности, т. е. создание так называемого гибридного протеза – комбинации синтетических и биологических материалов.

Имеющиеся к настоящему времени разработки протезов диаметром менее 5 мм такими известными фирмами, как Impra Inc. (USA), Gore-Tex (USA), Vitagraft (Japan) и других, не вышли за рамки фундаментальных и экспериментальных исследований. Это связано с тем, что специфические условия гемодинамики в естественных сосудах диктуют жесткие требования как к гемосовместимости материалов, предназначенных для изготовления сосудистых протезов малого диаметра, так и к конструкции изделий.

Для уменьшения риска тромбозов и тромбоэмболий из-за низкой скорости тока крови при имплантации сосудистых протезов малого диаметра первоначально использовали модификацию промышленно выпускаемых сосудов белковыми покрытиями (Rumisek, 1986; Drury, et al., 1987; Freischlag and Moore, 1990).

Интенсивное развитие в последние 10–15 лет генной и тканевой инженерии стимулировало разработку методов создания различных гибридных органов, и, в том числе, протезов кровеносных сосудов малого диаметра (Williams et al., 1994).

Сравнительно недавно рядом исследователей были получены первоначально достаточно обнадеживающие результаты по культивированию на внутренней поверхности синтетических протезов ксеногенных и аллогенных клеток различного типа, в основном эндотелиальных, для повышения биосовместимости имплантата (Zilla et al., 1994; Pasic et al., 1995; Noishiki et al., 1996). Следующим шагом явилось выращивание *in vitro* аутогенных эндотелиальных, гладкомышечных клеток и фибробластов на протезах из тканых материалах (дакрона и тефлона) (Margiotta et al., 1995; Poole-Warren et al., 1996) и из монолитного пористого полиуретана (Saad et al., 1998). Однако не удалось полностью предотвратить индуцированные имплантатом иммунные реакции организма на чужеродное тело, приводящие к хроническому воспалению. Более того, синтетическая основа сосудистых протезов в ряде случаев вызывала колонизацию бактерий с последующей инфекцией, что являлось одной из причин гибели животных (Mertens et al., 1995). Возможным способом устранения недостатков, свойственным синтетическим материалам, может стать использование в качестве матрикса для выращивания биоискусственного сосудистого протеза биосовместимых и биodeградируемых полимеров, например, «Biopol» (Imperial Chemicals Industries, Berlington, Великобритания) – бактериального полиэфира полиоксибутирата (ПОБ) – представителя нового класса биосовместимых материалов природного происхождения (полиоксиалканоатов, ПОА). Наиболее изученный среди ПОА полиоксибутират (ПОБ) (полимер β-гидроксимасляной кислоты), мономеры которого представляет основной продукт биодеструкции полимера, в норме является продуктом обмена веществ у высокоорганизованных организмов и одним из компонентов крови человека. Это важное свойство ПОБ делает его уникальным биodeградируемым биосовместимым материалом медицинского назначения (см. главы 2–3).

В 1986 г. появилось сообщение о попытке создания полностью биологического протеза, т. е. так называемого биоискусственного протеза без использования синтетических и ксеногенных материалов (Weinberg and Bell, 1986). Достоинствами таких протезов является их способность к самообновлению и самоконструированию. Отсутствие синтетических и ксеногенных материалов позволяло надеяться на устранение реакции «чужеродное тело-хозяин» и, как следствие, снижение риска инфекции и увеличение вероятности приживаемости протеза в организме человека. К большому сожалению, сконструированный *in vitro* биологический протез не обладал необходимой механической прочностью, поэтому, в конечном итоге, сосуд был армирован сеткой из дакрона. Позднее было создано несколько вариантов биоискусственных протезов кровеносных сосудов, но для их

функционирования *in vivo* также не удалось избежать армирования дакронем (L'Heureux et al., 1993; Hirai and Matsuda, 1996).

В 1998 г. были опубликованы результаты по разработке первого полностью биологического протеза (не армированного сеткой из дакрона) с напряжением на разрыв более 2000 мм Hg (L'Heureux et al., 1998), что соответствует аналогичному параметру для кровеносного сосуда человека. Результаты кратковременных (от 1 до 7 дней) испытаний протезов в экспериментах на собаках продемонстрировали легкость хирургического манипулирования с имплантатом и хорошую его функциональность. Есть все основания надеяться на положительные результаты при длительной имплантации полностью биологического протеза как в эксперименте, так и в клинике. Подтверждение этому является функционирование полностью биологических протезов артерий в течение 24 суток в экспериментах на мини-свиньях (Niklason et al., 1999).

### *Гибридные клапаны сердца*

Нарушения функций клапанов сердца являются одной из существенных причин смерти кардиохирургических больных. Например, в США по этой причине в год умирает около 10 000 человек. Ежегодно число операций по протезированию клапанов сердца увеличивается на 2 %. В США на 2000 г. прогнозировалось 81 100 подобных операций по сравнению с 75 200 в 1996 г. Существует два основных типа протезов клапана: механические и биологические, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки (таблица 1.6).

К основным материалам для элементов механических клапанов относятся пиролитический углерод и полиэфируретаны.

**Таблица 1.6**

**Сравнительные характеристики протезов клапанов сердца**

| Параметр                   | Механический клапан сердца | Биопротез           |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| Реакция организма          | Воспаление тканей          | Отторжение          |
| Кальцификация              | Не происходит              | Наблюдается         |
| Антикоагулянтная терапия   | Необходима                 | Не всегда требуется |
| Срок функционирования      | В течение всей жизни       | 7–12 лет            |
| Процент операций в 1996 г. | 60                         | 40                  |



Биоклапаны сердца делят на аллопротезы и ксенопротезы, в основном изготовленные из аортальных клапанов свиньи и бычьего перикарда. Последние достижения в области эффективных способов антикальциевой обработки биоклапанов существенно увеличили их прочность и долговечность работы, а тем самым и частоту применения при эндопротезировании (Schoen and Levy, 1999).

Биоискусственный (гибридный) клапан сердца, создаваемый с использованием технологий тканевой инженерии из собственных тканей пациента, является наиболее перспективным подходом к разработке биопротезов клапанов сердца нового поколения с медико-техническими характеристиками, аналогичными естественным клапанам (Mayer et al., 1997).

Основные требования, предъявляемые к биоискусственным клапанам, разрабатываемыми методами клеточной инженерии, перечислены в таблице 1.7 (Zund et al., 1998).

Положительные результаты использования клеточной инженерии для создания биоискусственного протеза клапана были получены при имплантации его элементов овцам в аортальную позицию (Shinoka et al., 1996; 1998). В качестве конструкционных материалов при формировании гибридного клапана сердца применяют биodeградебельные полимерные материалы типа полиоксибутирата и полигликолевой кислоты.

Дальнейший прогресс в этой области тесно связан с пониманием механизма высоко детерминированного и комплексного процесса морфогенеза клапанов сердца при их эмбриональном развитии. В частности, продолжает оставаться серьезной проблемой механическая стабильность биоискусственных клапанов в условиях реальной гемодинамики. Решение данной проблемы лежит на пути оп-

**Таблица 1.7**

**Обязательные свойства биоискусственных клапанов сердца**

| Свойства  |
|---|
| Эндотелизация контактирующей с кровью поверхности   |
| Способность к синтезу экстраклеточного матрикса, реконструкции до нормальной (природной) структуры и регенерации соответствующих структур |
| Необходимая гетерогенность, анизотропия и количество экстраклеточного матрикса  |
| Стабильность формы (геометрии) с потенциальной возможностью роста в организме пациента  |
| Отсутствие нежелательных иммунологических и других воспалительных процессов   |
| Стойкость к кальцификации и избыточному росту тканей (клеток)   |
| Стабильность механических свойств   |
| Большая эффективная площадь входного отверстия клапана  |
| Плотность закрытия створок  |
| Стойкость к инфекциям   |
| Химическая инертность и отсутствие гемолиза   |
| Простота техники имплантации  |

тимизации в условиях *in vitro* формирования не только коллагена, ответственного за механическую стабильность экстраклеточного матрикса, но и клеточных структур (Hoerstrup et al., 1999).

Предполагается, что в ближайшие 10–15 лет биоискусственные клапаны сердца, способные к адаптации и регенерации, не требующие антикоагулянтной терапии, постепенно вытеснят существующие механические клапаны сердца и биопротезы.

### *Гибридная печень*

Разработка новых более эффективных и доступных методов лечения или компенсации острой и хронической печеночной недостаточности (ПН) по-прежнему остается актуальной проблемой, так как смертность и нетрудоспособность при заболевании печени занимает одно из первых мест и не имеет тенденции к снижению (Трансплантология, 1995). По данным ВОЗ за 1994 г. среди причин летальности ПН занимает пятое место в мире среди других патологий и восьмое место среди причин нетрудоспособности.

Смертность от острой ПН, сопровождающейся обширным некрозом паренхимы колеблется от 50 % до 70–80 % и более. Один из эффективных методов лечения необратимых поражений печени – трансплантация печени имеет существенные ограничения, главным образом, в связи с возрастающей во всем мире нехваткой донорских органов.

В последние 10–15 лет стали разрабатываться новые методы лечения или компенсации ПН с использованием клеточных технологий (Трансплантология, 1995; Gerlach, 1996; Bioartificial Organs. Science, 1997; Galletti P and Jauregui, 1998; Jauregui et al., 1996; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III; 2001). Основными трудностями при разработке биоискусственной печени является их слабая пролиферирующая активность при культивировании клеток и очень низкая жизнестойкость. Это относится и к гепатоцитам свиньи – наиболее выживаемым клеткам среди всех исследованных гепатоцитов (Liu et al., 1996 a,b; Bioartificial Organs I, 1997; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001).

Существует несколько подходов для преодоления данных проблем. По направленности действия их можно разделить на две группы (Bioartificial Organs. Science, 1997; Yanagi et al., 1998; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001):

- внутримышечная имплантация пула изолированных гепатоцитов в микро- или макрокапсулах, в основном, на основе производных альгината и агарозы;
- перфузия крови или плазмы пациента с использованием экстракорпоральных устройств, содержащих свободную взвесь функционирующих донорских гепатоцитов (в основном, сви-

ные) или гепатоциты, иммобилизованные на носителях (полистирол) или внедренные в полимерные пористые материалы.

Достаточно эффективными оказались пористые гранулы на основе поливинил формал резины (Kanebo Kasei Co., Osaka, Japan) и полупроницаемые полые волокна типа Plasmaphan (AKZO-NOBEL, Wuppertal, Germany) с диаметром пор ~0,5 мкм (Lui et al., 1996b; Yanagi et al., 1998). Применение данных полимерных систем позволило получить оптимальные характеристики для функционирования гепатоцитов в биоискусственной печени (таблица 1.8).

Последние достижения в области биоискусственной печени с использованием гепатоцитов млекопитающих дали возможность начать ее широкое клиническое применение для поддержки функции печени пациента до проведения ортотопической трансплантации печени (Hughes and Williams, 1996; Sussman and Lake, 1996; Bioartificial Organs, 1997; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001).

### *Гибридная поджелудочная железа*

Сахарный диабет – одна из главных проблем эндокринологии, поскольку является широко распространенным заболеванием. По медико-социальной значимости он занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире в 1994 г. было около 110,4 млн больных сахарным диабетом, причем каждые 10 лет ожидается удвоение количество больных. В развитых странах заболеваемость сахарным диабетом среди людей, моложе 50 лет, составляет почти 3 %, из которых 85 % приходится на пациентов с сахарным диабетом II типа (инсулиннезависимый сахарный диабет).

В Российской Федерации зарегистрировано более 2 млн больных сахарным диабетом, в том числе около 300 тысяч инсулинозависимых (сахарный диабет I типа). Судя по результатам эпидемиологических

**Таблица 1.8**

**Биологические параметры, необходимые для функционирования биоискусственной печени**

| Необходимые параметры  | Параметры в биореакторах с пористыми гранулами и волокнами |
|--|--|
| Высокая плотность гепатоцитов  | Порядка $10^7$ клеток/см <sup>3</sup>                      |
| Поддерживание процессов метаболизма клеток   | Сравнима с монослойной культурой                           |
| Длительное сохранение функций гепатоцитов  | Не менее 1–2 недель  |
| Легкость масштабирования процесса (от лабораторного до промышленного производства) | Несколько литров на один биореактор                        |
| Асептические условия   | Полностью отсутствует любой вид инфекций                   |

исследований, реальное количество больных составляет более 8 млн человек. Несмотря на определенные достижения последних лет, современная терапия сахарного диабета по-прежнему не обеспечивает полноценной компенсации патологического состояния. Основной причиной ранней инвалидизации и сокращения продолжительности жизни являются диабетические ангиопатии и нейропатии. Поэтому ведется разработка новых подходов к лечению, которые могли бы существенно повлиять на течение диабетических ангиопатий. Одним из таких подходов, как альтернатива трансплантации поджелудочной железы при лечении инсулинозависимых больных, является создание биоискусственной поджелудочной железы. Созданные к настоящему времени гибридные системы, состоящие из функционирующих островковых клеток поджелудочной железы ( $\beta$ -клеток), заключенных в иммуноизолирующие мембраны можно разбить на три группы (Шумаков с соавт., 1995; Трансплантология, 1995; Bioartificial Organs, 1997; Brissova et al., 1998; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001):

- микрокапсулы с размером от 100 до 800 мкм;
- экстраваскулярные диффузионные камеры, включая макрокапсулы;
- интраваскулярные диффузионные камеры.

Источниками островковых клеток служат поджелудочная железа свиньи, быков и коров, кроликов, реже – плодов человека и новорожденных.

Широко используемыми материалами при микрокапсулировании  $\beta$ -клеток являются (Sun et al., 1993; Iwata et al., 1994; Ohgawara et al., 1994; Lanza et al., 1995; Shoichet et al., 1996; Bioartificial Organs, 1997; Shapiro and Cohen., 1998; Lacik et al., 1998; Hisano et al., 1998; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001):

- альгинат (смесь  $\beta$ -D-манурановой кислоты и  $\alpha$ -L-гуалуроновой кислоты) и его производные;
- агарозы и их производные;
- сульфат целлюлоза;
- полиакрилаты, например, сополимеры p-HEMA с метилметакрилатом;
- полиэлектролитные комплексы сульфат альгината с поли-L-лизинном;
- полиэтиленгликоли.

Среди перечисленных материалов наиболее часто применяют альгинат-лизин-альгинатные микрокапсулы (Park et al., 1993; Biomedical Polymers, 1994).

Макрокапсулы, экстра- и интраваскулярные диффузионные камеры изготавливаются из различных материалов (Park et al., 1993; Biomedical Polymers, 1994; Bioartificial Organs I, 1997; Bioartificial Organs II, 1999; Bioartificial Organs III, 2001):

- пористых систем из сегментированных полиэфируретанов (СПУ) и блоксополимеров СПУ с силоксанами;
- полупроницаемых мембран из полисахаридов;
- полупроницаемых мембран на основе производных альгинатов;
- полупроницаемых мембран из гидрогелей и их сополимеров на основе полиакриламидов, поливинилового спирта и полиакрилонитрил-сульфат метисульфоната (гидрогель AN69).

До клинических испытаний допущены пока гибридная поджелудочная железа с использованием алло- $\beta$ -клеток. По данным Международного регистра трансплантации островков поджелудочной железы с 1974 г. применена в медицинских центрах Европы и США на 236 больных. Пока только в 9 % случаев была достигнута инсулин-независимость реципиентов по меньшей мере в течение одной недели после начала функционирования гибридной системы.

Таким образом, главная особенность биоматериалов нового поколения заключается в моделировании (синтетические материалы) или в воспроизводстве (гибридные материалы) свойств живых биологических тканей таким образом, чтобы, при необходимости, полностью или частично, временно или постоянно заместить функции тех или иных утраченных органов.

Тем не менее, несмотря на определенный успех в области биомимитирования естественных органов и тканей, проблема разработки адекватных гибридных структур требует дальнейшего поиска новейших методов в области моделирования, синтеза, воспроизводства и анализа соответствующих биологических тканей (таблица 1.9) (Ratner, 1993).

**Таблица 1.9**

**Современные методы и подходы, которые могут быть использованы для разработки биоматериалов нового поколения (Ratner, 1993)**

| Конструирование           | Компьютерная химия<br>Молекулярная графика   |
|---------------------------|--|
| Синтез<br>Воспроизводство | Использование принципов: <ul style="list-style-type: none"> <li>– самосборки молекул</li> <li>– нанолитографии</li> <li>– эпитаксиального роста</li> <li>– пептидных синтезаторов</li> <li>– геной и тканевой (клеточной) инженерии</li> </ul>                           |
| Анализ                    | Сканирующая туннельная микроскопия<br>Атомная силовая микроскопия<br>Электронная микроскопия для химического анализа<br>Вторичная ионная масс-спектрометрия<br>Инфракрасная Фурье-спектрометрия<br>Дифракция низкоэнергетических электронов<br>Электронная спектроскопия |

## **Глава 2. ПОЛИОКСИАЛКАНОАТЫ – ПРИРОДНЫЕ ПОЛИЭФИРЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ**

Полиоксиалканоаты по ряду физико-химических свойств сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушающимися в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Помимо термопластичности, полиоксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. Полиоксиалканоаты чрезвычайно различаются между собой по структуре и свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более того, возможности получения на основе ПОА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющие направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность, температурные и другие характеристики, еще более усиливает привлекательность ПОА и расширяет возможные сферы применения.

Линейная структура молекул ПОА придает им свойство термопластичности и изменения прочности (возрастание по направлению растяжения). При нагревании молекулярные цепи в ПОА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов (прессования, экструзии и др.) получать из ПОА разнообразные изделия и материалы. Следует отметить, что при переработке и прессовании широко используемых в настоящее время многих синтетических пластиков необходимы различные добавки (стабилизаторы, наполнители, красители и пр.). Этого можно избежать при переработке полиоксиалканоатов, которые хорошо формуются из растворов и порошков. Гомогенный полиоксибутират по механическим свойствам сходен с полипропиленом и полистиролом, однако обладает лучшими газобарьерными свойствами (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью, при этом его проницаемость для водяного пара втрое ниже по сравнению с полипропиленом.

Из ПОА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, различных полых форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.), а также гелей и клеев. Совокупность свойств, характерных для ПОА, делает их перспективными для применения в различных сферах, – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах (Abe, Doi, 1992; Brandle et al., 1990; Luzier, 1992; Muller, Seebach, et al., 1993). Масштабы применения полиоксиалканоатов в настоящее время сдерживаются достаточно высокой стоимостью (практически на порядок более высокой по сравнению с полиолефинами). Однако возрастающие требования к охране окружающей среды, с одной стороны, и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет повышения эффективности производства, с другой, делают полиоксиалканоаты одним из перспективных материалов XXI века.

Уже сейчас сферы применения полиоксиалканоатов – самые различные. Данные материалы активно исследуются с целью переработки в США, Скандинавии и Европе, Японии, Германии и Голландии. Совет объединенной Европы утвердил концепцию необходимости замены не разрушаемых синтетических пластиков биodeградируемыми полимерами, а с 1993 г санкционировано применение упаковочной продукции из ПОА в пищевой промышленности.

## **2.1. История открытия и развития исследований полиоксиалканоатов**

Первым из полиоксиалканоатов был обнаружен полиоксибутират. В настоящее время известно свыше 100 различных полиоксиалканоатов. Полиоксиалканоаты накапливаются в бактериальных клетках в виде гранул, которые при окрашивании хорошо визуализируются микроскопически. Данные включения в бактериях наблюдал Бейеринк в 1888 году (цит. по Cromwick, 1963), но первое изучение ПОБ было проведено существенно позже (Lemoigne, 1927). Автор выделил из бактерий *Bacillus megaterium* два компонента, которые, по его мнению, являлись продуктом гидролиза полиоксибутирата. Оба продукта имели эмпирическую формулу ( $C_2H_3O_3$ ), один из них кристаллизовался, имел температуру плавления  $120^{\circ}C$ , другой был аморфен и плавился при  $157^{\circ}C$ . Позднее Лемонг доказал, что оба компонента являются полиоксибутиратом, но обладают различным молекулярным весом.

В течение последующих 30 лет особого интереса полиоксибутират не вызывал. И только после появления в 1958 году первой работы по физиологической роли ПОБ (Macrae, Wilkinson, 1958), к данно-

му соединению возник интерес. В этой работе авторы установили, что накопление ПОБ в бактериях происходит при высоких значениях соотношения углерод/азот в среде, а его распад наблюдается при отсутствии экзогенных источников энергии и углерода. Это позволило им предположить, что ПОБ является внутриклеточным резервным соединением.

После этой публикации интерес микробиологов и биохимиков к ПОБ начал возрастать, и в течение последующих 40 лет разворачивались всесторонние исследования природы процесса аккумуляции полиоксибутирата различными микроорганизмами. До конца 1973 г. ПОБ вызывал интерес главным образом в связи с его физиологической ролью в жизнедеятельности микроорганизмов и обусловленностью влиянием факторов среды на его синтез и реутилизацию. Разразившийся осенью 1973 г. нефтяной кризис и последующий рост цен на нефть как не возобновляемого источника энергии и сырья привел стран-участниц ОПЕК, контролирующую рынок пластмасс, к пониманию необходимости поиска альтернативных нефтехимическому синтезу полиолефинов способов получения пластиков.

В 1976 г. в Великобритании концерн ICI первым развернул коммерческие исследования микробиологического процесса получения полиоксибутирата на сахаросодержащих субстратах, извлекаемых из растительных биомасс (Senior, 1984). Но не только возможность синтеза ПОБ из возобновляемого сырья стимулировала и поддерживала эти исследования. Большой интерес вызвало сообщение о том, что бактериальный полиоксибутират термопластичен аналогично полипропилену (King, 1982). Выявленные другие свойства ПОБ – биоразрушаемость и биосовместимость, пьезоэлектрические свойства и возможность использования в качестве источника оптически активных молекул (Howells, 1982) не только поддерживали, но и усиливали интерес ICI к бактериальному процессу получения полиоксибутирата, несмотря на то, что нефтяной кризис стал спадать.

В последующие годы интерес к изучению процесса биологического синтеза полиоксибутирата расширялся. Было установлено, что ПОБ синтезируется с различными выходами многими прокариотическими микроорганизмами (к настоящему времени их насчитывается свыше 300) с использованием различных субстратов. Однако для промышленного применения было выделено всего несколько высокопродуктивных и перспективных микроорганизмов, эффективно синтезирующих полиоксибутират с использованием ряда субстратов: сахаров, метанола, углеводов, смесей водорода и углекислоты (водородокисляющие бактерии *Alcaligenes eutrophus* (недавно переименованные в *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, азотфиксаторы *Azotobacter vinelandii*, псевдомонады *Pseudomonas oleovorans*, метилотрофы



*Methylomonas*, *Methylobacterium organophilum* (Anderson, Dawes, 1990; Byron, 1987; 1992; 1994; Dawes, 1990; Braunegg et al., 1998).

Чистый полиоксибутират, однако, хрупок и мало устойчив к растяжению. Недостаточные эластичность и термостабильность ПОБ затрудняют процессы его переработки, что ограничивает возможные области применения. И если бы полиоксибутират был единственным полиоксиалканоатом, он, вероятно, не имел бы больших перспектив. Однако, из активного ила был выделен полимер, свойства которого отличались от ранее изученного полиоксибутирата. Детальный хроматографический анализ показал присутствие в полимере, помимо доминирующей оксимасляной кислоты, оксивалериановой, оксигексановой и, возможно, оксиоктановой кислот в качестве минорных компонентов (Wallen, Rohwedder, 1974). Это был первый обнаруженный гетерополимерный полиоксиалканоат.

Открытие способности микроорганизмов к синтезу гетерополимерных ПОА явилось сильным импульсом для расширения исследований данных биополимеров. Было обнаружено, что присутствие оксивалерата в ПОА существенно влияет на характеристики полимера, снижая температуру плавления и кристалличность материала, делая его по сравнению с полиоксибутиратом более эластичным, упругим и удобным для переработки (Luizier, 1992). Изменение соотношения мономеров в ПОА сопровождается существенными изменениями термомеханических и волоконных свойств материала. После этого поиск микроорганизмов, способных синтезировать гетерополимерные ПОА, был широко развернут во многих странах. Достаточно быстро было установлено, что ряд микроорганизмов в определенных условиях роста, помимо гомогенного полиоксибутирата, способен синтезировать различные полиоксиалканоаты, содержащие в качестве мономерных единиц сополимеры ПОБ и других оксипроизводных углеводородных кислот, – оксивалериановой, оксигексановой и т. д., до мономеров, состоящих из углеродных цепей различной длины, до C<sub>12</sub>. К настоящему моменту описано свыше 100 различных ПОА (Steinbüchel, Valentin, 1995), однако реально получаемые и исследуемые ПОА – это гомогенный полиоксибутират и сополимеры оксибутирата и оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ), а также оксибутирата и оксиоктаноата (ПОБ-со-ПОО). Выявляется, что ПОА различного химического состава обладают различной структурой и базовыми физико-химическими свойствами. Появляются сведения о влиянии параметров режима ферментации, главным образом, источника углеродного питания, на общий выход, состав и отдельные свойства полимеров (молекулярную массу, степень кристалличности, механическую прочность, скорости разрушения в природных и модельных средах) (Spyros et al, 1997; Kim et al., 1998; Pazur et al., 1998; Nagata et al., 1998; Avella et al., 2000a,b). Это открывает перспективы для

направленного синтеза биополимеров с заданными свойствами. Однако, эти чрезвычайно важные исследования, начаты сравнительно недавно, а имеющиеся сведения отрывочны и относятся в основном к двум типам ПОА, ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, синтезируемым несколькими микробными штаммами.

В конце 80-х – начале 90-х гг. были развернуты молекулярно-генетические исследования биосинтеза ПОА. К настоящему времени изучена и клонирована система синтеза полиоксибутирата из *Alcaligenes*, *Pseudomonas* и др. организмов; получены высокопродуктивные рекомбинантные штаммы-продуценты полиоксиалканоатов (Madison, Huisman, 1999), в т.ч. на основе *E.coli*, (Lee, Chang, 1994; Lee; 1996; Liu, Steinbüchel, 2000; Wong, Lee, 1998; Klinke et al. , 1999); *Pseudomonas putida* (Boynnton et al., 1999); дрожжей (Leaf et.al., 1996); а также трансгенные высшие растения с генами синтеза ПОБ – *Arabidopsis thaliana* (Poirier et al., 1992; 1995); кукуруза, хлопчатник и др. (Rinehart et al., 1996).

В настоящее время многопрофильные исследования полиоксиалканоатов проводятся весьма активно повсеместно. Среди большого количества научных коллективов, плодотворно работающих по проблемам синтеза и изучению свойств данных полимеров, признанными лидерами являются исследователи Института микробиологии, руководимые выдающимся ученым и основателем этих работ профессором Г. Шлегелем (Гетенген, Германия); Институт микробиологии во главе с его директором, профессором А. Стейнбюхелем (Мюнстер, Германия); коллектив профессора Y. Doi Технологического университета (Япония); лаборатория профессора Джендросека (Институт микробиологии Университета Штутгарта, Германия), коллектив, возглавляемый профессором Ли (Химико-биоинженерный центр, Южная Корея); лаборатории профессора Маршалта (Канада), профессора Реах (отделение микробиологии и молекулярной генетики Мичиганского университета, США), профессора Скандола (Отделение химии университета Болоньи, Италия), профессора Сински (Массачусетский институт технологи (MIT), США), профессора Витольта (Институт биотехнологии, Цюрих, Швейцария). В сфере коммерциализации ПОА активно работают также многие фирмы и промышленные компания, среди которых – Монсанто К°, Metabolix Inc., Tepha, Proctor & Gambel.

Исследования по микробиологическому синтезу полиоксиалканоатов в России начаты в 70-е годы. Однако публикации 70–80-х годов, главным образом, были связаны с изучением физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, принадлежащим к различным таксономическим группам и способных аккумулировать полимер-β-оксимасляной кислоты. Наибольшее количество работ было посвящено изучению физиологии водородокисляющих бакте-

рий, а также азотфиксирующих микроорганизмов и роли полиоксибутирата в процессах клеточного метаболизма и роста (Беляева, 1950; Савельева, Заварзин, Веденина, 1971; Заварзин, 1972; 1977; Романова, 1971; 1975; Романов с соавт., 1974; Романов, 1977; Кондратьева, Гоготов, 1981).

В 1977 году был опубликован первый отечественный обзор, подготовленный В. И. Романовым. Автор провел детальный анализ имеющейся литературы по системе биосинтеза, метаболизму поли- $\beta$ -оксималяной кислоты у микроорганизмов и ее роли в процессах жизнедеятельности организмов, принадлежащим к различным таксономическим группам.

В Институте микробиологии РАН под руководством академика Г. А. Заварзина было выделено, изучено и систематизировано большое количество новых штаммов хемолитотрофных водородокисляющих бактерий, детально исследованы их физиологические особенности, структурно-функциональная организация энергетической и анаболической систем, включая закономерности и стехиометрию синтеза полиоксибутирата (Савельева, Жилина, 1968; Савельева Заварзин, Веденина, 1971; Санжиева, Заварзин, 1971; Заварзин, 1972; 1977; 1982; Ножевникова, Заварзин, 1974; Романова, 1975).

В Московском государственном университете академиком Е. Н. Кондратьевой биохимические аспекты синтеза и внутриклеточной деградации полиоксибутирата как субстрата эндогенного дыхания были рассмотрены в фундаментальном цикле работ, связанном с изучением метаболизма водорода фототрофными, водородными и метилотрофными микроорганизмами (Кондратьева, Гоготов, 1981; Кондратьева, 1983). Впоследствии под руководством Е. Н. Кондратьевой был проведен скрининг коллекции фототрофных бактерий с целью отбора продуцентов полиоксибутирата и выявлена способность отдельных организмов (пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и зеленой бактерии *Chloreflexus auranticus* синтезировать до 40 % полимера при определенном соотношении углерода и азота в среде (Кондратьева, Красильникова, 1989).

Значению полиоксибутирата в процессах азотфиксации у свободноживущих и симбиотических диазотрофных микроорганизмов уделено большое внимание в цикле работ сотрудников Института микробиологии РАН и Института биохимии им. А. Н. Баха РАН. Исследована зависимость между внутриклеточным содержанием полиоксибутирата и активностью нитрогеназы и гидрогеназы у ряда штаммов *Rhizobium* (Бонарцева с соавт., 1988; 1989) и предложены новые флуоресцентные методы тестирования активности клубеньковых бактерий по накоплению полиоксибутирата (Бонарцева, 1985; Бонарцева, Мышкина, 1985).

Следует отметить, что вопросам детекции полиоксибутирата в клетках различных микроорганизмов уделено существенное внимание в отечественных исследованиях. Для этого были привлечены и модифицированы биохимический весовой метод (Калачева, Трубачев, 1978), методы ИК-спектроскопии (Анистратова, 1974; Загреба с соавт., 1980; 1982; 1990), оптические методы (Лопатин с соавт., 1996) и методы газожидкостной хроматографии (Волова с соавт., 1992; Короткова с соавт., 1997). С развитием исследований многокомпонентных полиоксиалканоатов для идентификации в составе полимеров микровключений оксикислот с различной длиной углеродной цепи стали использовать методы ЯМР высокого разрешения (Фалалеев с соавт., 1994) и хроматомасс-спектроскопию (Волова с соавт., 1999).

Значимость полиоксибутирата как объекта биотехнологических исследований была обозначена в конце 80-х начале 90-х годов на общесоюзных конференциях, которые были организованы ведущими микробиологическими учреждениями страны («Биосинтез вторичных метаболитов», Пущино–1987; «Лимитирование и ингибирование микроорганизмов», Пущино–1989; «Микробная конверсия», Рига–1990). К этому периоду сформировались научные коллективы, активно включившиеся в данную тематику. Среди них – Институт микробиологии АН СССР, Институт биохимии им. А.Н.Баха АН СССР, Институт физиологии и биохимии микроорганизмов АН СССР, Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна Латв. АН, Институт биофизики СО АН СССР.

Новые обзоры по проблемам биосинтеза полиоксибутирата появились в начале 90-х годов (Волова и Калачева, 1990а; Безбородов, 1991). Свообразным смотрам уровня работ в этом направлении можно считать Российскую конференцию «Биосинтез и деградация микробных полимеров», организованную Институтом физиологии и биохимии микроорганизмов РАН (Пущино, 1996).

В качестве потенциального продуцента полиоксибутирата научными коллективами были избраны микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes*). По всей вероятности, в выборе объекта исследователи исходили из опыта работы с теми или иными микроорганизмами на базе имеющихся научных заделов.

Так, группой к.б.н. Л. Ф. Савенковой (Институт микробиологии, г. Рига, Латвия) в качестве потенциального продуцента полиоксибутирата были избраны свободноживущие азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*. С помощью метода ИК-спектроскопии был проведен скрининг продуцентов полиоксибутирата, имеющихся в коллекции Института микробных штаммов, из которых были отобраны наиболее перспективные. Далее в результате селекции был получен клон (*Azotobacter* 83), характеризующийся способностью накапливать по-

лиоксибутират с высокими выходами (до 80 % и более) и не аккумулирующий полисахариды (Савенкова с соавт., 1987). Последние, как известно, не желательны, так как снижают выход полимера и затрудняют процедуру извлечения полимера из клеточной биомассы. Авторами были изучены закономерности накопления полиоксибутирата бактериями при изменении концентрации и формы азотного питания и напряжения кислорода в среде, и найдены условия, позволяющие получать высокие выходы полимера (Савенкова с соавт., 1990; Загребя с соавт., 1990). Были получены экспериментальные образцы полимера и совместно с Рижским политехническим институтом начаты исследования физико-химических свойств, включая молекулярную массу, температуру плавления и др. (Савенкова с соавт., 1988).

В Институте биохимии им. А. Н. Баха РАН группа к.б.н. Г. А. Бонарцевой сосредоточила свое внимание на азотфиксирующих клубеньковых бактериях рода *Rhizobium*. Сотрудниками исследована зависимость внутриклеточного содержания полиоксибутирата в клетках бактерий различных видов клубеньковых бактерий (*R. vigna*, *R. japonicum*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*) от активности ключевых ферментов (нитрогеназы и гидрогеназы). При этом выявлена обратная корреляция между активностью нитрогеназы и внутриклеточным содержанием полимера в анаэробных условиях и прямая зависимость между активностью гидрогеназы и внутриклеточным пулом полиоксибутирата (Бонарцева, 1985; Бонарцева с соавт., 1989). Полученные фундаментальные результаты важны для целенаправленного отбора промышленно значимых продуцентов полиоксибутирата. Авторами проанализированы закономерности синтеза полимера у отдельных штаммов и показана возможность стабильного его выхода (Загребя с соавт., 1980). При этом выявлено, что малоактивные штаммы характеризуются большей продукцией полиоксибутирата по сравнению с активными штаммами (Бонарцева с соавт., 1988). Далее были проведены комплексные исследования закономерностей аккумуляции полиоксибутирата различными по активности быстрорастущими штаммами клубеньковых бактерий (*Rhizobium phaseoli*, *R. meliloti*, *R. trifolii*) на разных источниках углерода и азота (Бонарцева с соавт., 1994). Установлена возможность избирательной индукции процесса накопления полимера в клетках бактерий условиями углеродного и азотного питания. На основе полученных результатов среди исследованных штаммов отобран организм, перспективный для массового получения полимера. Установлено, что малоактивный штамм *Rhizobium phaseoli* 680 на среде с нитратной формой азота и сахарозой способен накапливать до 65 % полиоксибутирата от абсолютно сухого вещества клеток. Синтезируемый полимер характеризуется высокими значениями молекулярного веса, свыше 1 000 000 Da. Совместно с Институтом нефтехимического синтеза РАН и другими органи-

зациями научный коллектив получает экспериментальные образцы полиоксибутирата, проводит исследование физико-химических и технологических свойств материала.

В Институте физиологии и биохимии микроорганизмов РАН были развернуты комплексные и систематические исследования метилотрофных микроорганизмов как объекта для биотехнологии полиоксибутирата. Под руководством профессора Ю. А. Троценко проведены обширные исследования способности к синтезу полиоксибутирата у метилотрофных микроорганизмов с различными биохимическими путями усвоения метанола, – в рибулозозомонофосфатном цикле (РМФ), сериновом цикле и рибулозобифосфатном цикле (РБФ) (Говорухина, Троценко, 1991). Авторами детально проанализированы 32 штамма и установлено, что наибольшие выходы полимера характерны для факультативных метилотрофов, реализующих сериновый или РБФ-пути усвоения метанола по сравнению с облигатными метиловыми бактериями с РМФ-путем. Максимальное содержание полиоксибутирата (до 80 %) зарегистрировано у пигментированных штаммов с сериновым путем. Это *Pseudomonas rhodos* ТК 0010 и *Protaminobacter rubber* ТК0003. Далее был выделен и охарактеризован новый факультативный метилотрофный штамм, синтезирующий полиоксибутират, отнесенный к *Methylobacterium extorquens* (Доронина с соавт., 1992). Детально изучен внутриклеточный состав липидов, включая состав ЖК, синтезируемых данным организмом. У штамма определены активности ряда ферментов при росте на метаноле и установлено, что в нем реализуется ИЦЛ-вариант серинового пути метаболизма метанола. Были проанализированы метаболические изменения, происходящие при переходе *Methylobacterium extorquens* от сбалансированного роста на полной питательной среде к режиму накопления полиоксибутирата при исчерпании из среды источника азота (Белова с соавт., 1997). Обнаруженные метаболические перестройки, происходящие в клетках данного продуцента полиоксибутирата, благоприятствующие синтезу полимера, весьма значимы, так как являются научной основой для целенаправленной оптимизации условий выращивания микроорганизма с целью повышения выхода полиоксибутирата. Было установлено, что аккумуляция полимера в клетках *M. extorquens* стимулируется дефицитом ионов аммония, сульфата, железа и магния в среде (Короткова с соавт., 1995). В результате варьирования условий углеродного питания на примере метилотрофных микроорганизмов с сериновым путем авторам удалось реализовать процесс получения сополимеров оксибутирата с оксивалератом при изменении соотношения мономеров в полимере в достаточно широких пределах. При общих выходах полимера около 50 % получены образцы с включением оксивалерата до 57.4 мол.% (Короткова с соавт., 1997). Изученные и подобранные условия культивирования метилотрофных организмов

позволили авторам реализовать лабораторную технологию получения полиоксисилканоатов и приступить к исследованию свойств (Козловский с соавт., 1999).

Большой массив информации о закономерностях синтеза полиоксисилканоатов водородными бактериями и их свойствах получен в Институте биофизики СО РАН, в котором комплексные исследования закономерностей физико-химической регуляции жизнедеятельности хемолитоавтотрофных микроорганизмов с целью разработки управляемых биотехнических систем для получения целевых продуктов и задач экологии проводятся с конца 70-х годов. В работе использованы штаммы, выделенные под руководством академика Г. А. Заварзина сотрудниками отдела литотрофных культур Института микробиологии РАН, и любезно переданные в Красноярск. Серия штаммов, включающая быстрорастущую водородокисляющую бактерию *Alcaligenes eutrophus* Z1 (Савельева, Жилина, 1968) и три штамма аэробных СО-окисляющих карбоксидобактерий – *Seliberia carboxydohydrogena* Z1062 (Санжиева, Заварзин, 1971), *Pseudomonas gazotropha* Z1156 и *Comamonas comransoris* Z1155 (Ножевникова, Заварзин, 1974) были введены в массовую культуру и всесторонне изучены в контролируемых условиях при изменении основных физико-химических параметров среды. Результаты исследований кинетики роста, трофики и биотехнологии данных микроорганизмов опубликованы в виде статей в центральных журналах, главным образом, в журнале «Микробиология» и «Прикладная биохимия и микробиология», а также обобщающих изданиях («Непрерывная культура водородных бактерий как средство биосинтеза белка», 1974; «Хемосинтез на водороде», 1978; Производство белка на водороде, 1980; Волова с соавт. Микробиологический синтез на водороде, 1985). Эти результаты дополнили знания о регуляции метаболизма при автотрофии на основе водорода и составили научную основу для практического применения данных микроорганизмов. Культура водородных бактерий *Alcaligenes eutrophus* была положительно оценена как потенциальное биорегенеративное звено замкнутой экологической системы жизнеобеспечения человека. Установлено, что в сочетании с электролизом воды бактериальное звено с водородными бактериями способно выполнять функции регенератора атмосферы и воды, утилизатора жидких выделений человека и воспроизводителя части рациона человека при существенно большей энергетической эффективности биосинтеза по сравнению с фототрофными организмами.

В Институте биофизики СО РАН разработана технология и создано первое в стране опытное производство белка одноклеточных на основе водорода. Проведенный в производственных условиях комплекс исследований биомассы водородных бактерий показал вы-

сокую биологическую ценность нового белкового продукта и эффективность применения в составе комбикормов вместо традиционных белков животного происхождения при выращивании различных с/х животных, птицы, пушных зверей. Всесторонне исследованы штаммы водородных бактерий и карбоксидобактерий, резистентные к окиси углерода. Выявлена специфика бактериальной устойчивости к окиси углерода, заключающаяся в наличии у бактерий СО-устойчивых гидрогеназ и способности за счет разветвления дыхательной цепи и усиления мембранного аппарата повышать потребление энергетического субстрата, обеспечивающего клеткам сохранение высокой белоксинтезирующей активности рибосом и скорости размножения в присутствии моноокси углерода (в концентрации до 10–20 % об.). Этими результатами экспериментально обоснована возможность использования для выращивания бактерий техногенных источников водорода. Исследован химический состав клеток и активность ключевых ферментов автотрофии водорода и окиси углерода во взаимосвязи с условиями культивирования бактерий, на этой основе отработаны режимы суперпродукции, помимо белка, ряда целевых продуктов (гидрогеназ, СО-оксидазы, цитохромов). Показана возможность использования иммобилизованных клеток и НАД-зависимой гидрогеназы бактерий для регенерации НАД, определения  $H_2$ , связывания СО из воздуха.

С 1990 года в Институте биофизики СО РАН проводятся комплексные исследования закономерностей микробного синтеза полиоксиалканоатов – термопластичных биоразрушаемых полимеров (ПОА), перспективных для применения в различных сферах. Накопленный опыт работы с данным микробиологическим объектом в течение предыдущих лет и знание характера влияния основных параметров среды на соотношение синтезируемых бактериями азотсодержащих и запасных клеточных макромолекул (углеводной и липидной природы, включая полиоксибутират) позволили за короткий срок оптимизировать условия эффективного синтеза полиоксибутирата водородными бактериями в различных культивационных условиях (Волова с соавт., 1989; 1990 б; 1992а,б). Исследованы закономерности аккумуляции полимера в условиях периодического культивирования бактерий. Выявлена связь между скоростью накопления и внутриклеточным содержанием полимера, физиологической активностью и размерами особей в популяции, находящейся в стадии аккумуляции, а также эндогенной деградации полимера (Волова, 1996б). Показана позитивная роль полиоксибутирата для выживания клеток при неоптимальных условиях среды (Волова с соавт., 1996д). Установлена способность к синтезу полиоксибутирата у нового микробного вида – аэробной карбоксидобактерии *S. carboxydohydrogena* и изучены условия синтеза (Волова с соавт., 1994б). Полу-



чено семейство сополимеров оксибутирата с оксивалератом и показана возможность управления соотношением сополимеров условиями углеродного питания (Волова с соавт., 1994а, б; 1996в, е; 1998). В рамках гранта МНФ Сороса исследована возможность аккумуляции бактериями гетерополимерных полиоксиалканоатов. Впервые показана способность природных штаммов водородокисляющих бактерий (*A. eutrophus* B5786 и *S. carboxydohydrogena* Z1062) синтезировать трехкомпонентные гетерополимерные полиоксиалканоаты, содержащие одновременно коротко- и среднецепочечные мономеры (Волова с соавт., 1996; 1998).

Разработаны и запатентованы штамм-продуцент и способы получения полиоксибутирата на основе бактерий *A. eutrophus*, позволяющие с высокими, не менее 70-75%, выходами в отличие от зарубежных решений на не пищевом сырье (смесь водорода и углекислоты или ацетате) получать полимер с молекулярным весом от сотен тысяч до млн. дальтон, а также способ получения сополимеров оксибутирата и оксивалерата с различными соотношениями сополимеров Волова, Калачева, 1996; Волова с соавт., 1996; Стасишина, Волова, 1996).

Лабораторная технология масштабирована в 30- и 50-литровом аппаратах, в результате определены материальные затраты сырья на синтез полимеров, а также синтезировано семейство полимеров в различных режимах, получены необходимые количества и изучены их свойства. Совместно с ИФ им. Л.В.Киренского СО РАН с использованием ЯМР и ЭПР высокого разрешения исследована молекулярная структура твердого полимера, а также пленок и нитей, полученных на его основе, и растворов полимера в дейтерохлороформе Фалалеев с соавт., 1994; Петраковская с соавт., 1995).

При поддержке Министерства науки и технологий РФ, в рамках проекта Российского фонда технологического развития был разработан Лабораторный технологический регламент получения полиоксибутирата на основе водородного биосинтеза и наработаны первые экспериментальные партии полиоксибутирата. Материал был передан для исследований и технологических испытаний. Совместно с Институтом нефтехимического синтеза РАН, ВНИИВолокно, ЦНИИ-бумаги, ВНИИмедполимер МЗ РФ была показана принципиальная возможность перерабатываемости полиоксибутирата в специальную продукцию (таблетки, нити, гибкие прозрачные пленки) различными методами: поливом из растворов, прессованием при комнатных и высоких температурах, экструзией из расплава. По методу гель-технологии впервые в России были получены мононити из полиоксибутирата, начато их ориентирование и изучение структуры. Впоследствии из образцов полимеров, синтезированных в ИБФ СО РАН, получены мононити из полиоксибутирата с хард-эластичными свойст-

вами, проведено их ориентирование, изучена структура и прочностные свойства (Gordeev, Nekrasov, 1999). В Институте сердечно-сосудистой хирургии им. Бакулева МЗ РФ были начаты исследования устойчивости и прочностных свойств полимерных пленок при экспозиции их в крови животных. Во ВНИИ бумаги на основе полиоксибутирата и полиэтилена высокого давления удалось получить композиции с различным соотношением компонентов, из которых были отлиты смесовые пленки и показана принципиальная возможность применения композитов для ламинирования бумаги. На кафедре промышленной биотехнологии Московского химико-технологического института им. Д. И. Менделеева проведено исследование влияния полиоксибутирата на типичную микрофлору мясных и молочных продуктов. В ходе трехмесячных экспериментов не было выявлено неблагоприятного воздействия полимерных пленок при их контакте с микроорганизмами на рост и развитие колоний нескольких десятков штаммов.

В последние годы усилия коллектива исследователей Института биофизики СО РАН сосредоточены на изучении закономерностей биосинтеза полиоксиалканоатов различного состава с использованием новых источников углеродного питания и изучении структуры, физико-химических, в т.ч. специальных свойств различных образцов. При поддержке Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (грант REC-002) по программе «Фундаментальные исследования и высшее образование» реализована концепция экологизации технологий на примере новой химико-биологической технологии получения полиоксиалканоатов, вписывающихся в биосферные циклы. В результате выявленных закономерностей биосинтеза и оптимизированного режима газификации бурых углей научно обоснована, разработана и впервые в биотехнологической практике реализована технология получения ПОА на синтез-газе (Volova et al., 2002; Волова с соавт., 2003; Щипко с соавт., 2003). С конца 90-х годов совместно с Институтом трансплантологии и искусственных органов МЗ России развернуты комплексные медико-биологические исследования полиоксиалканоатов и экспериментальных образцов изделий медицинского назначения из них (Волова с соавт., 2000; Шишацкая с соавт., 2000; 2001а,б; 2002а,б,в,г,д; Шишацкая. 2003; Shishatskaya et al., 2003; Севастьянов с соавт., 2001; Sevastianov et al., 2003; Volova et al., 2003).

В настоящее время в рамках проекта Международного научно-технического фонда (ISTC) совместно с ООО «Биохиммаш» оптимизируется и масштабируется до уровня Опытного производства лабораторная технология производства полимеров и изделий медицинского назначения из них. Институт биофизики СО РАН по различным

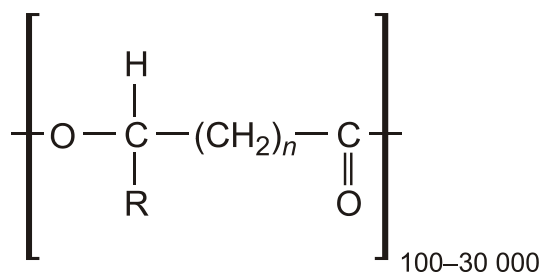
аспектам биотехнологии и материаловедения полиоксиалканоатов сотрудничает с Институтом физики им. Л. В. Киренского СО РАН, Институтом химии и химической технологии СО РАН, Красноярским государственным университетом, Сибирским технологическим университетом, НИИ ортопедии и медицинского материаловедения Томского научного центра СО РАМН, Научно-исследовательским Институтом трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, Гематологическим научным центром РАМН, Институтом микробиологии Мюнстерского университета (Германия), Лабораторией мембранной технологии университета Страйкланда (Великобритания) и другими.

## 2.2. Разнообразие полиоксиалканоатов

После открытия в 1974 г. в активном иле полимера, отличающегося по структуре и свойствам от известного полиоксибутирата (Wallen, Rohwedder, 1974), были развернуты широкие исследования по выявлению новых полиоксиалканоатов, изучению условий их синтеза и свойств. К настоящему времени известно более 100 различных по структуре полимеров, синтезируемых природными, а также генетически модифицированными микроорганизмами. Этому направлению исследований уделяется большое внимание в связи с тем, что даже при незначительном изменении соотношения мономерных единиц в ПОА могут принципиальным образом изменяться их свойства, в том числе термомеханические, что является важным для практики.

Наиболее полное представление о разнообразии полиоксиалканоатов дано в обзоре Стейнбухеля и Валентина (Steinbüchel, Valentin, 1995b), в котором собраны данные об известных типах ПОА, механизме их образования и природе микроорганизмов-продуцентов. Среди охарактеризованных к настоящему времени полиоксиалканоатов выделено несколько групп полимеров (таблица 2.1).

Основные структуры полиоксиалканоатов можно иллюстрировать следующим образом (Lee, 1996a):



|         |             |                               |
|---------|-------------|-------------------------------|
| $n = 1$ | R = водород | – поли (3-гидроксипропионат), |
|         | R = метил   | – поли (3-гидоксибутират),    |
|         | R = этил    | – поли (3-гидроксивалерат),   |
|         | R = пропил  | – поли (3-гидроксигексаноат), |
|         | R = пентил  | – поли (3-гидроксиоктаноат),  |

|         |             |                                 |
|---------|-------------|---------------------------------|
|         | R = нонил   | – поли (3-гидроксидодеканонат), |
| $n = 2$ | R = водород | – поли (4-гидроксибутират),     |
| $n = 3$ | R = водород | – поли (5-гидроксивалерат).     |

Большинство из известных типов оксикислот, образующих полимеры, детектированы в качестве составляющего продукта биосинтеза полиоксиалканоатов. Среди них – полимеры различного состава, содержащие:

**А)** 3-оксикислоты с различной длиной 3-оксиуглеродной цепи, от 3-оксипропионовой до 3-оксигексадекановой кислоты (в таблице, соответственно, позиции от #1 до #12);

**Б)** ненасыщенные 3-оксиалкеновые кислоты с одной (от #22 до #34, #49, #73, #76, #90) или двумя (#35) двойными связями в R- боковой группе;

**В)** метиловые группы в различном положении R-боковых групп в полимере (от #36 до #49, #90);

**Г)** не содержащие 3-оксикислот, а образованные из 4-оксимасляной кислоты (#13), 4-оксивалериановой (#14), 4-оксигексановой (#15), 4-оксигептановой (#16), 4-оксиоктановой (#17), 4-оксидекановой (#18), 5-оксивалериановой (#19), 5-оксигексановой (#20), и 6-оксидодекановой (#21);

**Д)** 3-оксикислоты с различными функциональными группами, образованными в R-боковых группах, включая свободные карбоксильные группы, такие как яблочная кислота (#50), карбоксильные группы, этерифицированные с алкильными группами (от # 51 до #58) или бензойную кислоту (#59); ацетоокси группы (#60, #61), связанные с R-боковыми группами и феноксигруппами (от #62 до #65), *para*-цианофенокси группы (от #66 до #68) или *para*-нитрофенокси группы (#69), связанные с R-боковыми группами (#70) или циклогексильной группой (#71) с основной углерод-углеродной связью. Кроме того, обнаружены оксикислоты со второй оксигруппой ((#72, #73) или с эпокси группой (от #74 до #76), а также другие типы ПОА, содержащие  $\omega$ -углеродный атом оксикислоты с включенной цианогруппой (#77, #78) или атомы галогенов – такие, как флюорин (#79, #80), хлорин (#81, #82) или бромин (от #83 до #85);

**Е)** оксикислоты с модифицированными боковыми группами, среди них 3-оксиалкеновые кислоты с двойными связями, например, 3-окси-2-бутеновая кислота ((#86) (#87), и ряд 3-оксикислот с метиловыми группами у  $\alpha$ -углеродного атома (от #88 до #90).

В связи с тем, что состав мономеров, акцептируемый ПОА-синтазой, зависит от субстратной специфичности синтаз, а также способности микроорганизмов утилизировать разнообразные соединения углерода, безусловно, имеется реальная основа для идентификации в будущем новых типов ПОА. Например, определена спо-

способность ряда микроорганизмов использовать в качестве субстрата для синтеза полиоксиалканоатов яблочную кислоту (#91).

Среди охарактеризованных ПОА есть группа соединений, которые детектированы не в условиях лабораторных чистых микробных культур, а в местах, богатых углеродным субстратом с высокой концентрацией природных микроорганизмов, которые синтезируют помимо оксимасляной кислоты (#2), многие другие оксикислоты. Так, из активного ила сточных вод плантации в Пиории выделены ПОА, содержащие, помимо оксибутирата (#2), 3-оксивалерат (#3), 3-гексаноат (#4) и в следовых количествах – 3-оксигептановую кислоту (#5) (Wallen and Rohwedder, 1974). В активном иле сточных вод Веберда (Швеция) выделен ПОА, содержащий оксибутират (#2), оксигексаноат (#4), оксиоктаноат (#6) (Odham et al., 1986). В сточных водах на одной из домашних плантаций в окрестностях Токио выделен и охарактеризован ПОА, содержащий 3-оксибутират (#2), 3-оксивалерат (3), 3-окси-2-метилмасляную кислоту (#88) и 3-окси-2-метилвалерат (#89). В речной эстуарии обнаружен полимер, содержащий, помимо 3-оксибутирата, в качестве сополимеров еще 5 других оксикислот: 3-оксивалерат (#3), 3-оксигептаноат (#5), 3-оксиоктаноат (#6), 3-окси-6-метилгептаноат (#39) и 3-окси-7-метилоктаноат (#43) (Findlay and White, 1983). Эти данные свидетельствуют о том, что консорциумы микроорганизмов, развивающиеся в условиях комплексного углеродного субстрата, способны к синтезу сложных, в т. ч. необычных полиоксиалканоатов.

На момент написания этой обзорной работы (Steinbüchel, Valentin, 1995b) по многообразию полиоксиалканоатов профессор А. Стейнбюхель намеренно оставил незаполненными ячейки в таблице 2.1, полагая, что список полимеров этого класса будет пополняться. И он был прав. К настоящему моменту обнаружены и идентифицированы новые представители полиоксиалканоатов. Среди них – оптически активный этил 4-хлоро-3-оксибутират (Suzuki et al., 1996); метил (R)-4-хлоро-3-оксибутират и (S)-3-окси-γ-бутиролактон (Suzuki et al., 1998); сульфосодержащие полимеры с тиоэфирными связями (Takagi et al., 1999); сополимеры 3-оксибутирата и 3-меркаптопропионата P(3-HB-co-3MP) (Lütke-Eversloh et al., 2001).

При анализе всего многообразия полиоксиалканоатов установлено, что полимеры, синтезированные биологическим путем, имеют R-конфигурацию и не имеют L-конфигурации. Оксикислоты в гидроксигруппах в α-положении обнаружены только для яблочной кислоты, включенной в ПОА в условиях биосинтеза *in vitro* (#91) и в ε-положении у 6-оксидодеканоата (#21).

Таблица 2.1

## Известные типы полиоксисалканоатов (по данным Steinbüchel, Valentin, 1995b)

|   |  |                                 |
|---|--|---------------------------------|
| ① |  | 3-Hydroxypropionic acid         |
| ② |  | 3-Hydroxybutyric acid           |
| ③ |  | 3-Hydroxyvaleric acid           |
| ④ |  | 3-Hydroxyhexanoic acid          |
| ⑤ |  | 3-Hydroxyheptanoic acid         |
| ⑥ |  | 3-Hydroxyoctanoic acid          |
| ⑦ |  | 3-Hydroxynonanoic acid          |
| ⑧ |  | 3-Hydroxydecanoic acid          |
| ⑨ |  | 3-Hydroxyundecanoic acid        |
| ⑩ |  | 3-Hydroxydodecanoic acid        |
| ⑪ |  | 3-Hydroxytridecanoic acid       |
| ⑫ |  | 3-Hydroxytetradecanoic acid     |
| ⑬ |  | 4-Hydroxybutyric acid           |
| ⑭ |  | 4-Hydroxyvaleric acid           |
| ⑮ |  | 4-Hydroxyhexanoic acid          |
| ⑯ |  | 4-Hydroxyheptanoic acid         |
| ⑰ |  | 4-Hydroxyoctanoic acid          |
| ⑱ |  | 5-Hydroxyvaleric acid           |
| ⑲ |  | 5-Hydroxyhexanoic acid          |
| ⑳ |  | 6-Hydroxydodecanoic acid        |
| ㉑ |  | 3-Hydroxy-4-pentenoic acid      |
| ㉒ |  | 3-Hydroxy-4-trans-hexenoic acid |
| ㉓ |  | 3-Hydroxy-4-cis-hexenoic acid   |

Таблица 2.1 – продолжение

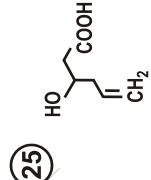
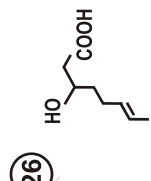
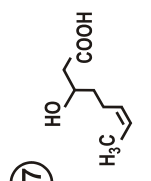
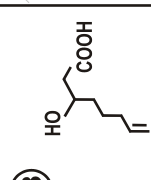
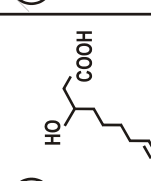
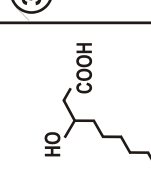
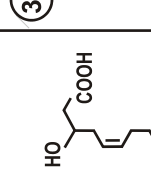
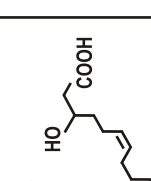
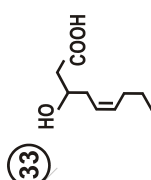
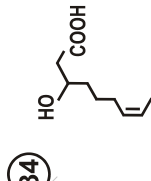
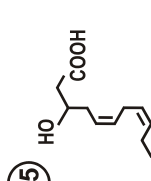
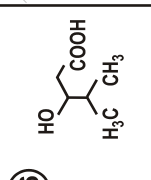
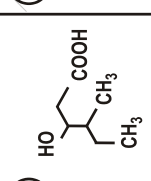
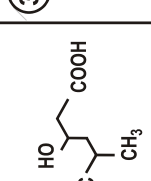
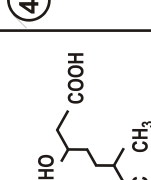
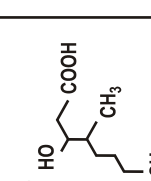
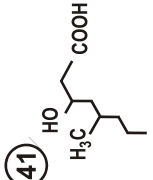
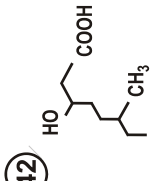
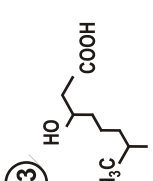
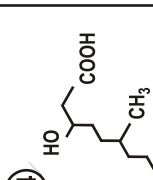
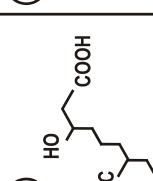
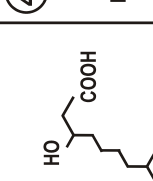
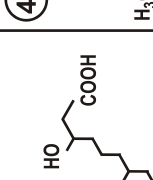
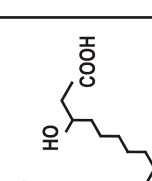
|   |   |   |   |  |   |   |   |
|---|---|---|---|--|---|---|---|
| <p>(25) </p> <p>3-Hydroxy-5-hexenoic acid</p>          | <p>(26) </p> <p>3-Hydroxy-6-trans-octenoic acid</p>    | <p>(27) </p> <p>3-Hydroxy-6-cis-octenoic acid</p>            | <p>(28) </p> <p>3-Hydroxy-7-octenoic acid</p>        | <p>(29) </p> <p>3-Hydroxy-8-nonenoic acid</p>        | <p>(30) </p> <p>3-Hydroxy-9-decenoic acid</p>        | <p>(31) </p> <p>3-Hydroxy-5-cis-dodecenoic acid</p>  | <p>(32) </p> <p>3-Hydroxy-6-cis-dodecenoic acid</p>  |
| <p>(33) </p> <p>3-Hydroxy-5-cis-tetradecenoic acid</p> | <p>(34) </p> <p>3-Hydroxy-7-cis-tetradecenoic acid</p> | <p>(35) </p> <p>3-Hydroxy-5,8-cis-cis-tetradecenoic acid</p> | <p>(36) </p> <p>3-Hydroxy-4-methylvaleric acid</p>   | <p>(37) </p> <p>3-Hydroxy-4-methylhexanoic acid</p>  | <p>(38) </p> <p>3-Hydroxy-5-methylhexanoic acid</p>  | <p>(39) </p> <p>3-Hydroxy-6-methylheptanoic acid</p> | <p>(40) </p> <p>3-Hydroxy-4-methyloctanoic acid</p>  |
| <p>(41) </p> <p>3-Hydroxy-5-methyloctanoic acid</p>   | <p>(42) </p> <p>3-Hydroxy-6-methyloctanoic acid</p>   | <p>(43) </p> <p>3-Hydroxy-7-methyloctanoic acid</p>         | <p>(44) </p> <p>3-Hydroxy-6-methylnonanoic acid</p> | <p>(45) </p> <p>3-Hydroxy-7-methylnonanoic acid</p> | <p>(46) </p> <p>3-Hydroxy-8-methylnonanoic acid</p> | <p>(47) </p> <p>3-Hydroxy-7-methyldecanoic acid</p> | <p>(48) </p> <p>3-Hydroxy-9-methyldecanoic acid</p> |

Таблица 2.1 – продолжение

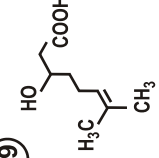
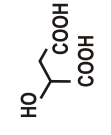
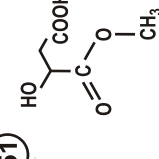
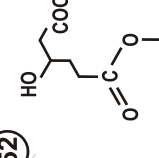
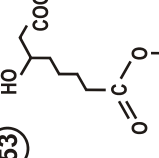
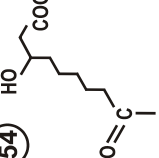
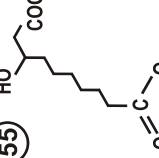
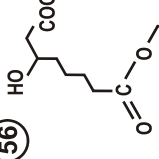
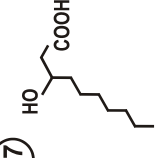
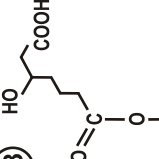
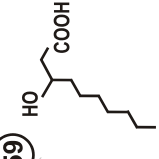
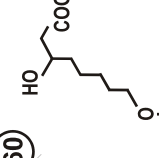
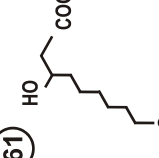
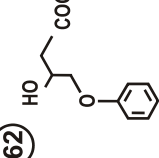
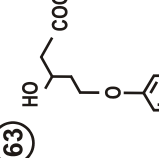
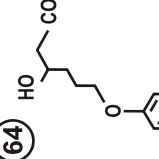
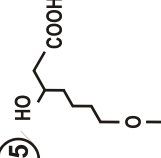
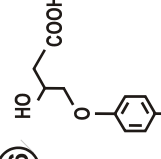
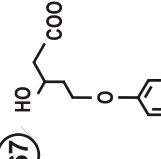
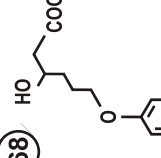
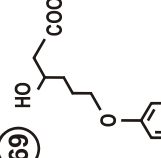
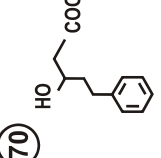
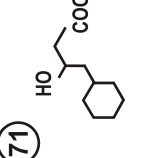
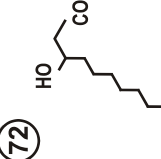
|  |   |   |   |  |   |   |  |
|--|---|---|---|--|---|---|--|
| <p>(49) </p> <p>3-Hydroxy-7-methyl-6-octenoic acid</p>  | <p>(50) </p> <p>Malic acid</p>                               | <p>(51) </p> <p>3-Hydroxysuccinic acid – methyl ester</p>    | <p>(52) </p> <p>3-Hydroxyadipinic acid – methyl ester</p>      | <p>(53) </p> <p>3-Hydroxysebacic acid – methyl ester</p>       | <p>(54) </p> <p>3-Hydroxyazelaic acid – methyl ester</p> | <p>(55) </p> <p>3-Hydroxysebacic acid – methyl ester</p> | <p>(56) </p> <p>3-Hydroxysebacic acid – ethyl ester</p> |
| <p>(57) </p> <p>3-Hydroxysebacic acid – ethyl ester</p> | <p>(58) </p> <p>3-Hydroxypimelic acid – propyl ester</p>     | <p>(59) </p> <p>3-Hydroxysebacic acid – benzyl ester</p>     | <p>(60) </p> <p>3-Hydroxy-8-acetyloxyoctanoic acid</p>         | <p>(61) </p> <p>3-Hydroxy-9-acetyloxy-nonanoic acid</p>        | <p>(62) </p> <p>Phenox-3-hydroxybutyric acid</p>         | <p>(63) </p> <p>Phenox-3-hydroxyvaleric acid</p>         | <p>(64) </p> <p>Phenox-3-hydroxyheptanoic acid</p>      |
| <p>(65) </p> <p>Phenox-3-hydroxyoctanoic acid</p>      | <p>(66) </p> <p>para-Cyanophenoxy-3-hydroxybutyric acid</p> | <p>(67) </p> <p>para-Cyanophenoxy-3-hydroxyvaleric acid</p> | <p>(68) </p> <p>para-Cyano-phenoxy-3-hydroxyhexanoic acid</p> | <p>(69) </p> <p>para-Nitro-phenoxy-3-hydroxyhexanoic acid</p> | <p>(70) </p> <p>3-Hydroxy-5-phenylvaleric acid</p>      | <p>(71) </p> <p>3-Hydroxy-5-cyclohexylbutyric acid</p>  | <p>(72) </p> <p>3,12-Dihydroxydodecanoic acid</p>      |



Таблица 2.1 – окончание

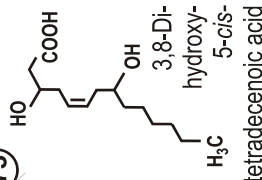
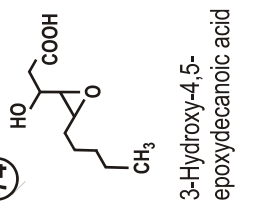
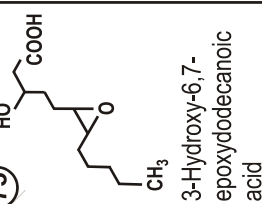
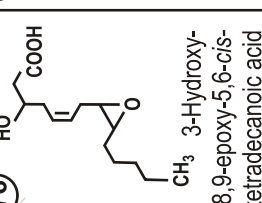
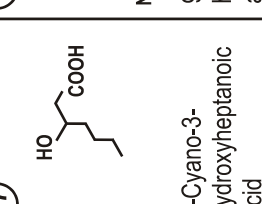
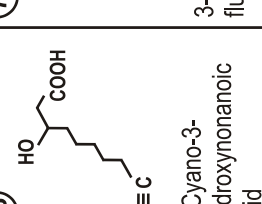
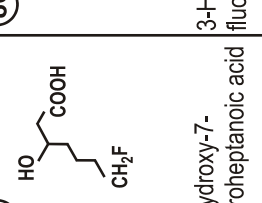
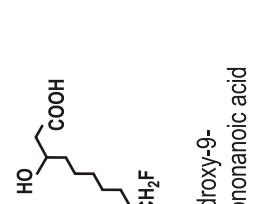
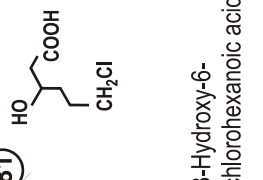
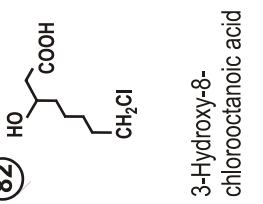
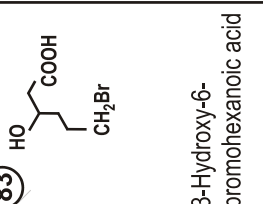
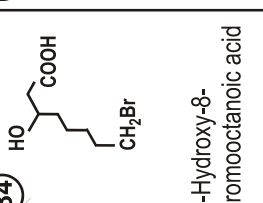
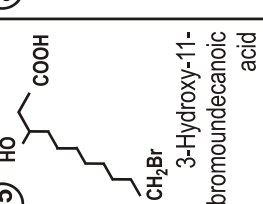
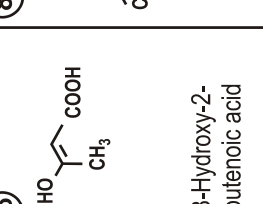
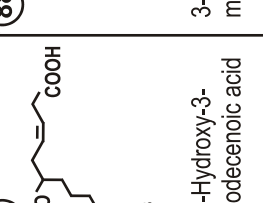
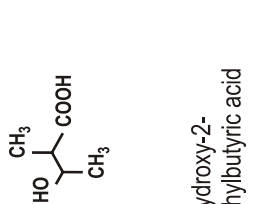
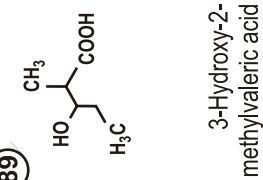
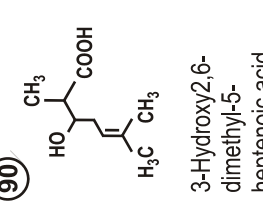
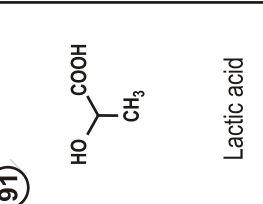
|  |   |   |  |   |   |  |  |
|--|---|---|--|---|---|--|--|
| <p>(73) </p> <p>3-Hydroxy-6-chlorohexanoic acid</p> | <p>(74) </p> <p>3-Hydroxy-4,5-epoxydecanoic acid</p>         | <p>(75) </p> <p>3-Hydroxy-6,7-epoxydodecanoic acid</p> | <p>(76) </p> <p>3-Hydroxy-5,6-cis-8,9-epoxytetradecanoic acid</p> | <p>(77) </p> <p>7-Cyano-3-hydroxyheptanoic acid</p>   | <p>(78) </p> <p>9-Cyano-3-hydroxynonanoic acid</p> | <p>(79) </p> <p>3-Hydroxy-7-fluorooheptanoic acid</p> | <p>(80) </p> <p>3-Hydroxy-9-fluorononanoic acid</p> |
| <p>(81) </p> <p>3-Hydroxy-2-methylvaleric acid</p>  | <p>(82) </p> <p>3-Hydroxy-8-chlorooctanoic acid</p>          | <p>(83) </p> <p>3-Hydroxy-6-bromohexanoic acid</p>     | <p>(84) </p> <p>3-Hydroxy-8-bromooctanoic acid</p>                | <p>(85) </p> <p>3-Hydroxy-11-bromoundecanoic acid</p> | <p>(86) </p> <p>3-Hydroxy-2-butenic acid</p>       | <p>(87) </p> <p>6-Hydroxy-3-dodecenoic acid</p>       | <p>(88) </p> <p>3-Hydroxy-2-methylbutyric acid</p>  |
| <p>(89) </p> <p>3-Hydroxy-2-methylvaleric acid</p> | <p>(90) </p> <p>3-Hydroxy-2,6-dimethyl-5-heptenoic acid</p> | <p>(91) </p> <p>Lactic acid</p>                       |  |   |   |  |  |

Таблица 2.2

## Возможные типы полиоксисалканоатов\*

|      |    | длина гидроксиалкановых кислот |        |     |     |      |      |     |     |     |      |      |       |      |      |       |       |      |
|------|----|--------------------------------|--------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-------|------|------|-------|-------|------|
|      | C1 | C2                             | C3     | C4  | C5  | C6   | C7   | C8  | C9  | C10 | C11  | C12  | C13   | C14  | C15  | C16   | C17   | C18  |
| 1-ОН | -  | -                              | -      | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -    | -     | -    | -    | -     | -     | -    |
| 2-ОН | -  | глико-<br>лат                  | лактат | 2НВ | 2НV | 2ННх | 2ННр | 2НО | 2НН | 2НD | 2НUD | 2НDD | 2НГiD | 2НTD | 2НPD | 2ННxD | 2ННрD | 2НOD |
| 3-ОН | -  | -                              | 3НР    | 3НВ | 3НV | 3ННх | 3ННр | 3НО | 3НН | 3НD | 3НUD | 3НDD | 3НГiD | 3НTD | 3НPD | 3ННxD | 3ННрD | 3НOD |
| 4-ОН | -  | -                              | -      | 4НВ | 4НV | 4ННх | 4ННр | 4НО | 4НН | 4НD | 4НUD | 4НDD | 4НГiD | 4НTD | 4НPD | 4ННxD | 4ННрD | 4НOD |
| 5-ОН | -  | -                              | -      | -   | 5НV | 5ННх | 5ННр | 5НО | 5НН | 5НD | 5НUD | 5НDD | 5НГiD | 5НTD | 5НPD | 5ННxD | 5ННрD | 5НOD |
| 6-ОН | -  | -                              | -      | -   | -   | 6ННх | 6ННр | 6НО | 6НН | 6НD | 6НUD | 6НDD | 6НГiD | 6НTD | 6НPD | 6ННxD | 6ННрD | 6НOD |
| 7-ОН | -  | -                              | -      | -   | -   | -    | 7ННр | 7НО | 7НН | 7НD | 7НUD | 7НDD | 7НГiD | 7НTD | 7НPD | 7ННxD | 7ННрD | 7НOD |

\*Steibüchel, Valentin, 1995 b: выделены гидроксиалкановые кислоты, которые постоянно определяются как элементы ПОА биосинтеза (остальные – не всегда). Кислоты: НВ – оксимасляная, НV – оксивалериановая, ННХ – оксигексановая, ННр – оксигептановая, НО – гидроксиктановая, НН – гидроксинановая, НD – гидроксидекановая, НUD – гидроксидекакановая, НDD – гидроксидодекановая, НГiD – гидрокситридекановая, НTD – гидрокситетрадекановая, НPD – гидроксипентановая, ННxD – гидроксигексадекановая, ННрD – гидроксигептадекановая, НOD – гидроксоктадекановая. НА<sub>SCl</sub>, НА<sub>MCL</sub>, НА<sub>LCL</sub> соответственно, коротко – , средне – и длинноцепочечные ПОА.

В целом, исходя из длины углеродной цепи оксикислот, образующих полимеры, полиоксиалканоаты подразделяют на три основные группы (таблица 2.2):

1) короткоцепочечные (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;

2) среднецепочечные (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

3) длинноцепочечные (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот  $C_{17}$  и  $C_{18}$ .

Данное разделение полимеров на группы базируется на существующем представлении о субстратной специфичности ПОА-синтаз, акцептирующих определенные оксикислоты при строительстве полимерной цепи в процессе полимеризации (Anderson, Dawes, 1990). Ранее считалось, что ПОА синтаза *A. eutrophus* и других природных штаммов способна полимеризовать оксикислоты, состоящие из 3–5 углеродных атомов, но не взаимодействует с оксикислотами с длиной углеродной цепи 6 и более. Поэтому представлялось невозможным получение коротко- и среднецепочечных ПОА природными штаммами *Alcaligenes*. Однако к настоящему моменту подтверждена более широкая субстратная специфичность РНА-синтез у природных штаммов, включая *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (Chen et al., 2001), *Ralstonia eutropha* (Волова со соавт., 1998; Grenn et al., 2002) и продемонстрирована способность данных организмов к одновременному синтезу коротко- и среднецепочечных ПОА.

Синтазы из различных штаммов *P. oleovorans*, обладающие более широкой субстратной специфичностью, акцептируют оксикислоты, содержащие от 6 до 14 атомов углерода, поэтому способны синтезировать разнообразные, как средне-, так и длинноцепочечные ПОА (Doi, 1990; Steinbüchel, 1991; 2001; Byron, 1992, Steinbüchel, Valentin, 1995).

Последовательность реакций синтеза полиоксиалканоатов иллюстрирует схема (рис. 2.1). Процесс можно подразделить на три этапа: на первом происходит транспорт источника углерода, необходимого для синтеза полимеров, из внешней среды в клетку, который катализируется специфическими ферментными транспортными системами, локализованными в цитоплазматической мембране или расположенными диффузно внутри клетки. Вторая фаза, включающая комплекс анаболических и катаболических реакций, конвертирует компоненты в гидроксацил коэнзим-А, тиоэфир которого является субстратом для ПОА-синтазы. На третьем этапе, ПОА синтаза (ключевой фермент биосинтеза данных полимеров), использует тиоэфиры как субстраты и катализирует образование эфирных связей между ними при участии КоА. Данное представление не допускает, что ПОА синтаза для образования полимеров также использует другие

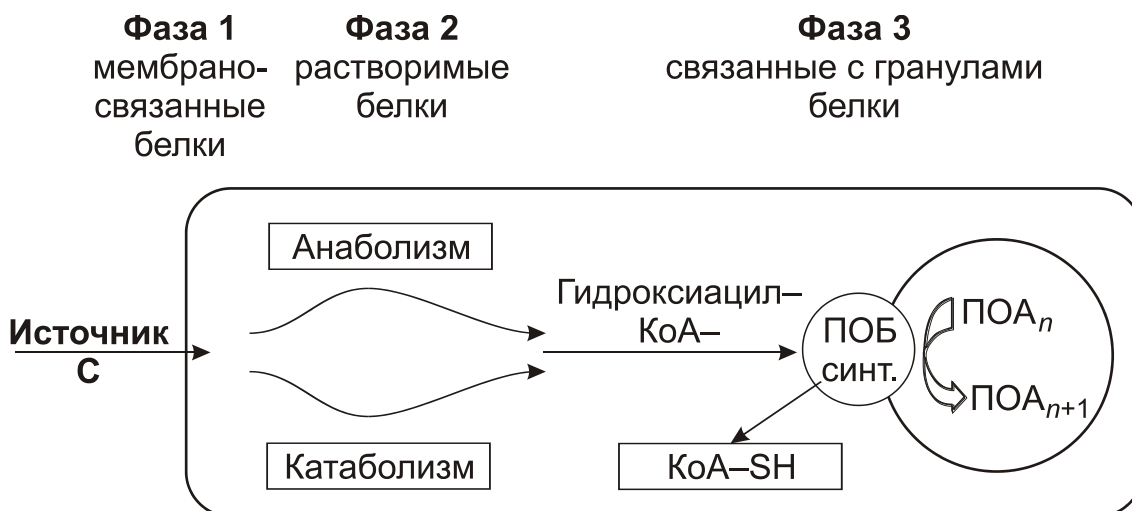


Рис. 2.1. Этапы синтеза ПОА в бактериях (Steinbüchel, Valentin, 1995b).

тиоэфиры гидроксикислот. Вторая фаза – очень существенна для процесса в целом, т. к. во время нее источник углерода конвертируется в субстраты, необходимые для синтеза ПОА. Многие бактерии способны превращать КоА последовательно в ацетацетил КоА и далее – в *D(-)*-3-гидроксибутирил-КоА, дающий начало полиоксибутирату (Anderson, Dawes, 1990).

Охарактеризованные к настоящему моменту типы ПОА теоретически могут дать возможность для получения нескольких миллионов вариантов полимеров. Комбинирование генов систем биосинтеза коротко-, средне- и длинноцепочечных ПОА и варьирование условий выращивания микроорганизмов уже сейчас позволяет получать полиоксиалканоаты разнообразнейших структур: полиоксибутират, полиоксивалерат, полиоксигексаноат, полиоксиоктаноат и двух-, трех- и четырехкомпонентные смеси с различным набором и соотношением гидроксibuтирата и гидроксивалерата, гидроксигексаноата и гидроксioктаноата (Tim et al., 1992; Steinbüchel, Valentin, 1995b; Braunegg et al., 1998).

### 2.3. Биохимические пути синтеза полиоксиалканоатов

Полиоксиалканоаты синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Знание закономерностей структурно-функциональной организации внутриклеточного цикла ПОА дает возможности управления этим процессом и основу для синтеза полимеров с новыми свойствами.

На примере наиболее изученного из полиоксиалканоатов – полимера β-оксимасляной кислоты, установлено, что пути его синтеза

практически одинаковы у различных микроорганизмов (*Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*) (рис. 2.2).

Условия, обеспечивающие изменение направления анаболизма клеток с белковой программы в сторону синтеза и аккумуляции полиоксibuтирата, определяются окислительно-восстановительным состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией пирувата и свободного КоА (Oeding and Schlegel, 1973; Senior and Dawes, 1973). При оптимальных условиях роста пируват, а также восстановительные эквиваленты в виде НАДН и НАДФН расходуются в основном в цикле трикарбоновых кислот на образование аминокислот, а также преобразование энергии в клетке, при этом сохраняется высокий уровень сво-

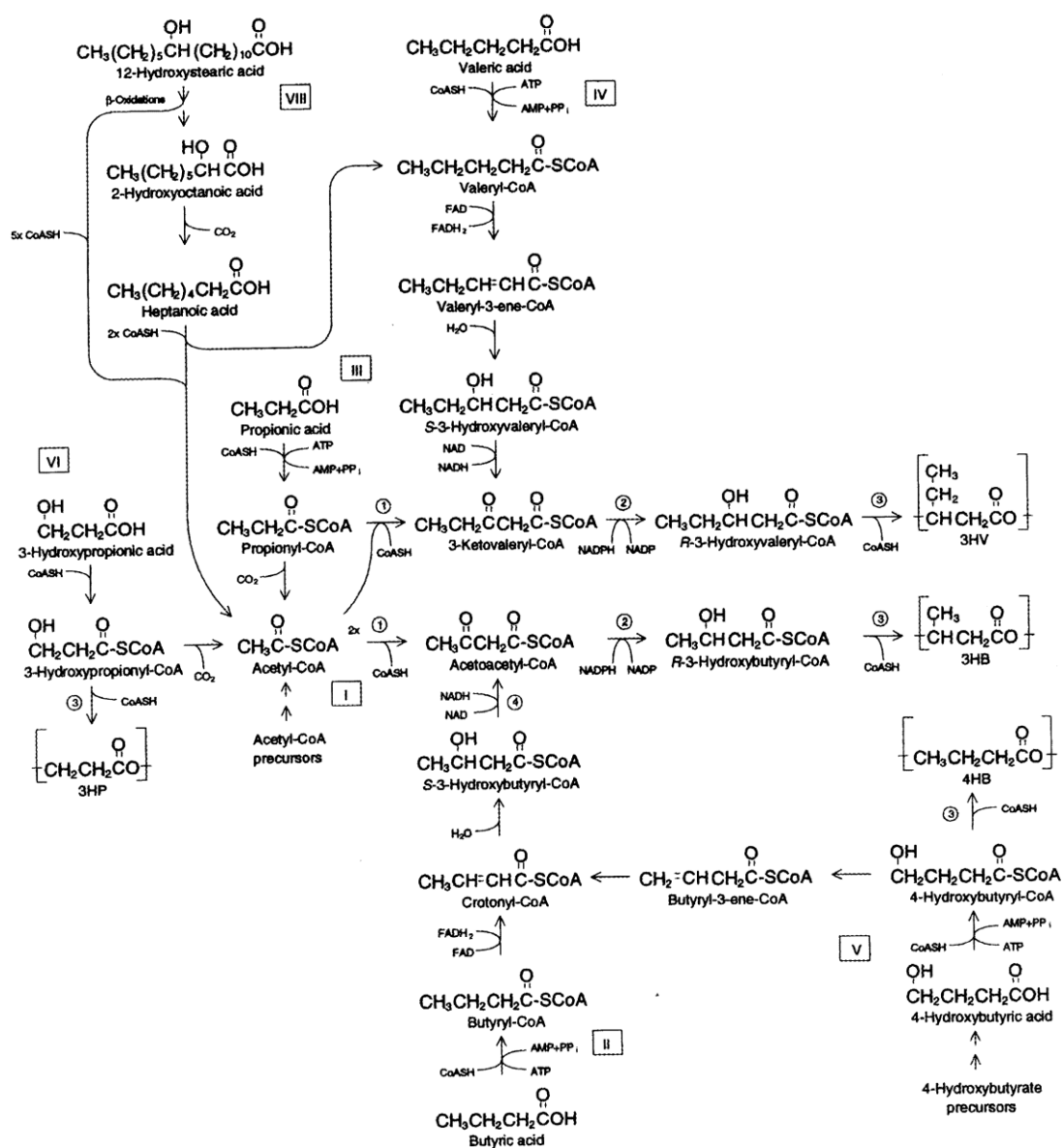


Рис. 2.2. Обобщенная схема синтеза ПОА у *R. eutropha*

1 – β-кетотиолаза; 2 – НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза; 3 – ПОА-синтаза; 4 – НАДН-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза (Braunegg et al., 1998).

бодного КоА, что является препятствием для синтеза ПОБ. При несбалансированном росте, например при отсутствии азота в среде или дефиците кислорода, пируват не включается в цикл трикарбоновых кислот, а подвергается карбоксилированию с образованием ацетил-КоА, уровень свободного КоА при этом низок, что является благоприятным условием для активизации ферментов цикла ПОБ.

Полиоксибутират и другие ПОА ассоциируются в клеточной цитоплазме в виде включений (гранул); предложенная модель их формирования (Gerngross, Martin, 1995) показана на рис. 2.3.

Прежде всего, растворимая ПОБ-полимераза (синтаза) взаимодействует с возрастающими концентрациями 3-оксибутирил-КоА в цитоплазме, приводя к праймингу фермента. По мере роста длины цепи олигомеры далее формируются в мицеллы. Мицеллоподобные

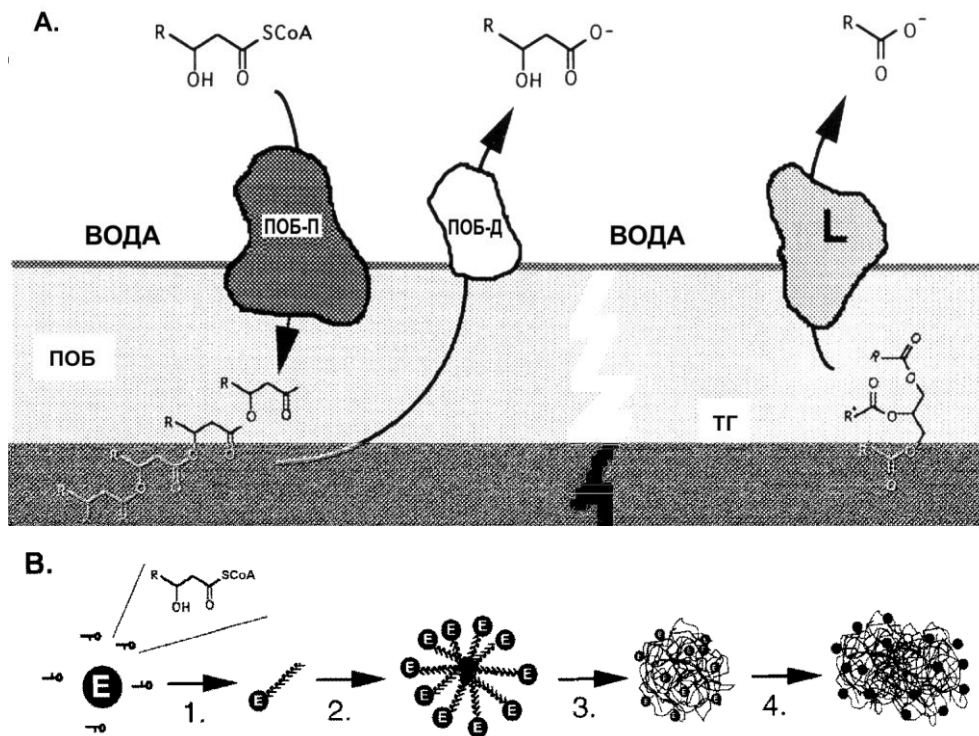


Рис. 2.3.

А. Сходство между ПОБ полимеразой и липазой. ПОБ-полимераза (ПОБ-П) действует на поверхности гранулы ПОБ, где происходит полимеризация растворимых предшественников, которые собираются в гидрофобной области на поверхности гранулы. ПОБ-деполимераза (ПОБ-Д) также действует на поверхности, высвобождая мономеры из полимера. Обе эти реакции сходны с реакциями, катализируемыми липазами (L), которые гидролизуют эфирные связи триглицеридов (ТГ) на границе раздела фаз вода/триглицериды.

В. Предполагаемый механизм образования гранул ПОБ. Растворимый фермент конвертирует мономер КоА в олигомеры, которые остаются связанными с ферментом (этап 1). При критической длине олигомера и концентрации комплекса «фермент-олигомер» образуются мицеллы (этап 2). Мицеллы постепенно укрупняются и приобретают форму гранул (этап 3). С ростом числа гранул происходит их слияние, что приводит к образованию крупных агрегатов ПОБ (этап 4).

частицы дают границу раздела фаз с полимеразой, расположенной внутри. Фермент затем быстро продолжает ПОБ синтез, вытесняя большее количество ПОБ в возрастающую гранулу. Авторами установлено также, что минимальные условия, необходимые для активации синтеза ПОБ, заключаются в наличии 3-гидоксибутирил-КоА как субстрата и ПОБ-полимеразы.

В последующих исследованиях было показано, что с увеличением размеров гранул в анализируемых пробах возрастает количество белка независимо от того, является ли этот белок ПОБ-полимеразой или несвязанным белком типа сывороточного альбумина (Martin, Gerngross, 1996). Белок, кодированный *phaP* геном, определяющий размер ПОА гранул, был идентифицирован в генетических исследованиях *R. eutropha*. Иммунохимический анализ с антителами показал, что этот белок всегда связан с гранулами и не присутствует в цитоплазме дикого типа в свободном виде. Характеристики *phaP* связанных белков напоминают таковые олеозинов, – белков, которые связываются исключительно с жировыми телами, выполняя структурную роль и предотвращая срачивание тел. По этой причине, *phaP*-подобные белки обычно упоминаются как фазины. К настоящему времени организующая роль белков, связанных с гранулами полимера, показана и для других полимерсинтезирующих микроорганизмов (Stuart et al., 1998; Valentin et al., 1998; Fuller and Clinton, 1999).

Деполимеразы, вызывающие деструкцию полимера, синтезируются микроорганизмами как внутриклеточно, так и внеклеточно. Внутриклеточная деградация ПОБ исследована не так детально, как синтез и внеклеточная деградация полимера, хотя этот процесс может играть решающую роль для физиологии бактерий, продукции полимера в клетке, его качественного состава. Гидролиз полимера осуществляется последовательно ферментами ПОА-деполимеразой, (Д)-оксибутират дегидрогеназой и ацетоацетил-КоА-синтазой (кетотиолазой) (Doi, 1990). Продуктом деградации ПОБ являются мономеры, димеры и короткоцепочечные полимеры Д(-)-3-гидроксибутирата в соотношении 80–85 %, 15–20 % и следовых количествах, соответственно. Димеры и мономеры Д(-)-3-гидроксибутирата, образованные на первом этапе деградации ПОБ, гидролизуются под действием димер-гидролаз (эстераз) до мономеров. Гидролаза не проявляет активности в отношении других эфиров, а также нативных гранул ПОБ или очищенного ПОБ и ингибируется диизопропилфторфосфатом. Мономеры 3-гидроксибутирата превращаются под действием НАД-зависимой гидроксibuтиратдегидрогеназы в ацетоацетат. Ацетоацетат вступает в трансферазную реакцию с сукцинил-КоА, катализируемую тиофоразой (ацетоацетат: сукцинил-КоА КоА-трансфераза), в результате которой образуется ацетоацетил-КоА

(Saito et al., 1995; 1996). Под действием кетотиолазы ацетоацетил-КоА превращается в ацетил-КоА, который поступает на энергетические и анаболические нужды клетки.

## 2.4. Генетика внутриклеточной системы синтеза ПОА

Начиная со второй половины 80-х годов, исследования по проблеме микробиологического синтеза полиоксипропионатов начали существенно обогащаться работами по молекулярной генетике микроорганизмов, синтезирующих ПОА. Биосинтетический путь образование полиоксипропионата, как было показано, представлен тремя реакциями, которые катализируются тремя ферментами (рис. 2.4). Первый фермент – кетотиолаза – кодируется геном *phbA*; второй – редуктаза – геном *phbB*; и третий – полимеразы – геном *phbC*.

Во второй половине 80-х годов была создана библиотека генов *Z. ramigera* и клонирована в *E. coli*. С помощью анти-тиолазных антител был выделен ген *phbA* и было показано, что *phbA* и *phbB* образуют один оперон, а *phbC* локализуется на другом участке хромосомы (Peoples, Sinskey, 1989 a, b). Практически одновременно с этими работами были клонированы и охарактеризованы гены синтеза ПОБ из *R. eutropha* (Schübert et al., 1988). Было показано, что гены  $\beta$ -кетотиолазы (*phbA*), ацетил-КоА редуктазы (*phbB*), ПОА синтазы (*phbC*) образуют один оперон с промотором, оператором и структурными генами (Schübert et al., 1991). Установлено, что три фермента синтеза ПОА кодируются в следующем порядке – синтаза, тиолаза и редуктаза (Peoples, Sinskey, 1989b). Синтез ПОА контролируется на уровне транскрипции (Slater et al., 1988). Недавно были выделены, секвенированы три гена синтеза ПОБ из *A. latus* и экспрессированы в *E. coli* (Genser et al., 1998). Результаты секвенирования свидетельствуют о высокой гомологии (71–80 %) этих генов с генами *R. eutropha*, идентичности ориентации и организации соответствующих оперонов. Существенные отличия выявлены только в структуре и активности промотора, которая значительно выше в *A. latus*. На основании этих результатов авторы предполагают общность происхождения генов, ответственных за синтез ПОБ, у *A. latus* и *R. eutropha*.

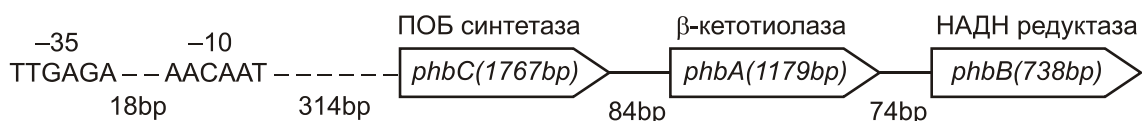


Рис. 2.4. Организация оперона синтеза ПОА у *A. eutrophus* (Peoples, Sinskey, 1989; Steinbüchel et al., 1992)



К настоящему времени клонировано 42 структурных гена ПОА синтазы из 38 различных микроорганизмов, относящихся к различным физиологическим группам. Для 30 генов определена нуклеотидная последовательность, что должно помочь в дальнейшем в понимании функционировании этого фермента (Rehm, Steinbüchel, 1999).

Структура оперонов, ответственных за синтез ПОА, из различных организмов существенно отличается по расположению генов. Так, в *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas acidophila*, подобно вышеописанным *A. latus* и *R. eutropha*, гены *phbCAB* образуют один оперон, хотя порядок их расположения может отличаться (Peaples, Sinskey, 1989; Umeda et al., 1998; Madison, Huisman, 1999). В *Paracoccus dinitrificans*, *Rhizobium meliloty* and *Z. ramigera* локусы *phbAB* и *phbC* генов не связаны (Tombolini et al., 1995; Ueda et al., 1996; Peoples, Sinskey, 1989). ПОА полимеразы из *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Synechocystis* представлена двумя субъединицами и кодируется двумя генами *phbE* и *phbC*. В этих организмах *phbAB* и *phbEC* гены находятся в одном локусе, но имеют дивергентную ориентацию (Hein et al., 1997; Liebergesell, Steinbüchel, 1992;1993). В *Methylobacterium extorquens*, *Nocardia corallina*, *Rhizobium etli*, *Rodococcus ruber*, *Rodobacter sphaeroides* был идентифицирован только ген ПОА полимеразы (Cevallos et al., 1996; Hall et al., 1998; Hustede, Steinbüchel, 1993; Pieper, Steinbüchel, 1992; Valentin, Steinbüchel, 1993). Полимеразный ген у *Aeromonas caviae* соседствует с *phbJ* геном, участвующим в синтезе мономеров ПОА (Fucui, Doi, 1997). В продуцентах средне- и длинноцепочечных ПОА (*P. oleovorans* и *P. Aeruginosa*) содержатся два *phaC* гена, разделенных геном *phbZ*, кодирующим внутриклеточную ПОА деполимеразу. Две полимеразы, как оказалось, идентичны на 50–60 % по первичной структуре и обладают очень близкой субстратной специфичностью (Huijberts et al., 1992; Huisman et al., 1991; Timm, Steinbüchel, 1992).

Данные по разнообразию структуры генома, кодирующего систему синтеза ПОА, дают почву для некоторых рассуждений по поводу ее эволюции. Когда бактерии впервые приобрели способность синтезировать полимер, то, вероятнее всего, он не играл роль запасного материала. Образование ПОА было, возможно, минорным метаболическим путем у этих организмов и результатом какой-либо побочной реакции. Когда синтез полимера стал физиологически значимым для микробов, вероятно, произошла селекция штаммов, аккумулирующих ПОА под воздействием определенных условий, которые в настоящее время неизвестны. Знание этих условий могут быть чрезвычайно полезными для оптимизации процессов получения ПОА рекомбинантными организмами. В процессе эволюции ген, кодирующий фермент ПОА-синтазу, комбинировался с генами, ответственными за синтез мономеров, или с генами, включенными в другие реакции ПОА метаболизма, например *phbZ*. В результате селекции в

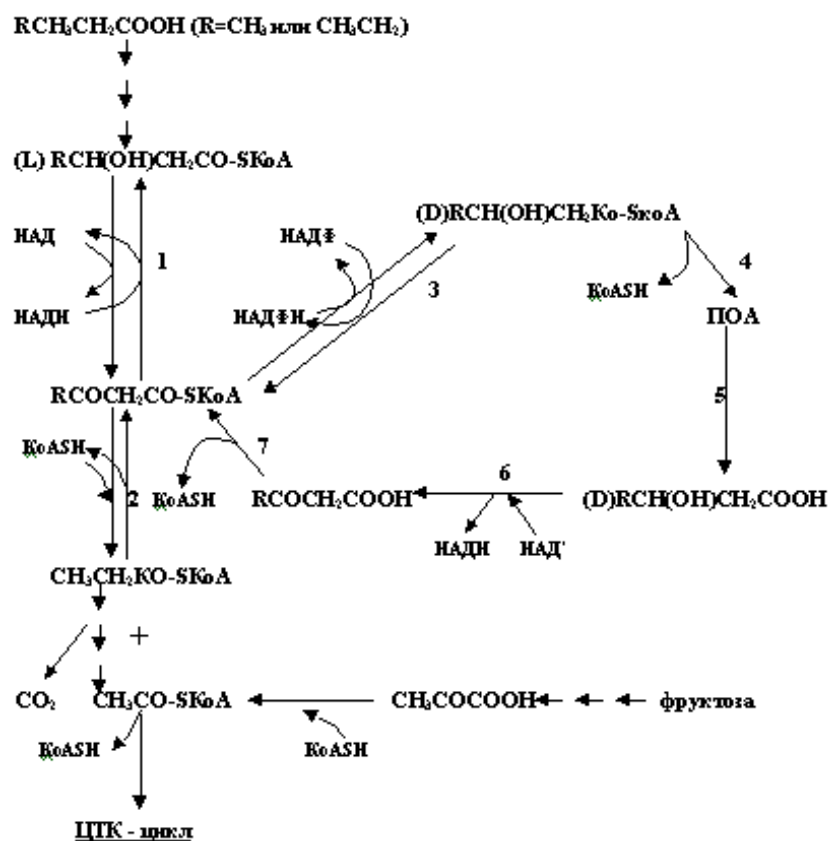


Рис. 2.5. Цикл полиоксиалканоатов у *A. eutrophus*:

- 1 -НАДН-зависимая ацетацетил-КоА редуктаза, 2 – 3-кетотиолаза, 3 – НАДФН-зависимая ацетацетил-КоА редуктаза, 4 – ПОБ-синтаза (полимераза), 5 – ПОБ -деполимераза, 6 – D(-)-3-оксибутират дегидрогеназа, 7 – ацетацетил-КоА синтаза (тиофораз)
- (Doi et al., 1990).

ряде микроорганизмов все *phb* гены объединились в один оперон, а в других – разделились на отдельные транскрипционные единицы.

Таким образом, ключевыми ферментами синтеза ПОА являются кетотиолаза, редуктаза и ПОА-полимераза (синтаза). Путь внутриклеточной деградации ПОБ заключается в деполимеризации ПОБ деполимеразой (гидралазой) до димеров и мономеров; мономеры под воздействием бутиратдегидрогеназы превращаются в ацетат, который ацетацетил-КоА синтазой (тиофоразой) в трансферазной реакции превращается в ацетацетил-КоА, являющийся субстратом для кетотиолазы, трансформирующей его в ацетил-КоА. Последний утилизируется внутриклеточно в системах катаболизма и анаболизма. Таким образом, кетотиолаза является первым ферментом синтеза и последним ферментом деградации в цикле ПОБ (Oeding, Schlegel).

В последние годы все чаще появляются, в большей степени предположительные, сообщения о циклической природе системы синтеза и деградации ПОБ в клетках. Например, об этом свидетельствуют опыты по изучению переключения синтеза ПОБ на ПОБ-со-

ПОВ у *A. eutrophus* на разных углеродных субстратах (Doi et al., 1990). Клетки, содержащие 55 % ПОБ от абсолютно сухого вещества клетки, выращивали на пентановой кислоте в условиях азотного лимита. В течение 96 часов гомополимер был заменен сополимером, содержащим 44 мол. % бутирата и 56 мол. % валерата. После пересева клеток в среду, содержащую бутират, уровень оксивалерата в полимере упал с 56 % до 19 %. Эти результаты авторы объясняют тем, что в клетках одновременно идет синтез и деградация полимера. Это позволяет перестраивать состав полимера в зависимости от подаваемого углеродного субстрата. Циклический процесс ПОА метаболизма можно проиллюстрировать схемой (рис. 2.5) из работы (Doi et al., 1990). Аналогичная модель цикличности внутриклеточного процесса синтеза и деградации ПОБ предложена для *Azospirillum brasilense* (Tal et al., 1990).

Однако изучение обмена ПОБ у водородных бактерий, выращиваемых в условиях непрерывной культуры на среде с высоким соотношением C/N и с добавлением меченой глюкозы, показали, что радиоактивность в биомассе и в полимере падает с одинаковой скоростью. Авторы считают, что в течении роста не происходит существенного обмена ПОБ, а активность деполимеразы или очень низкая, или не проявляется совсем (Haywood et al., 1989).

## 2.5. Продуценты полиоксиалканоатов

Список микроорганизмов, способных с теми или иными выходами внутриклеточно аккумулировать полиоксибутират или продукты сополимеризации ПОБ с другими оксипроизводными жирных кислот, быстро пополняется. К настоящему времени он насчитывает свыше 300 организмов (Anderson, Dawes, 1990; Steinbüchel, Valentin, 1995; Braunegg et al., 1998; Madison, Huisman, 1999). Среди описанных организмов – аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорганотрофы и хемотрофы, фототрофные прокариоты. (*Azotobacter*, *Alcaligenes*, метанотрофы *Bacillus*, *Nocardia*, *Methylobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Zoogloea*); аэробные фотобактерии (*Chloroglaea*, *Chloroflexus*); олиготрофные полипростековые бактерии (*Labrys*, *Prosthecomicrobium*, *Stelle*), архебактерии (*Haloferax*), анаэробные фототрофные бактерии (*Chromatium*, *Rhodospirillum*) и другие.

Несмотря на имеющееся разнообразие изученных микроорганизмов, аккумулирующих ПОА, для промышленного использования рассматривается очень небольшое число продуцентов. Среди них – хемоорганотрофный организм *Ralstonia* (до недавнего времени известный как *Alcaligenes*), способный использовать различные источники углерода и гетеротрофные микроорганизмы, относящиеся к трем таксонам – *Methylophilus*, *Methylobacterium* и *Pseudomonas*

(Anderson, Dawes, 1990; Lee, 1996; Choi, Lee, 1997; 1999; Steinbüchel, Valentin, 1995; Braunegg et al., 1998; Madison, Huisman, 1999).

В качестве критериев для выбора потенциального продуцента полиоксиалканоатов принято рассматривать следующие показатели: химический состав (по соотношению С-мономеров, в % к полимеру), выход полимера (в % по отношению к весу абсолютно сухого вещества клетки), затраты углеродного субстрата (ед. веса/ед. веса ПОА), концентрацию биомассы клеток в культуре (вес/ед.объема), продуктивность процесса (ед. веса ПОА/ед. объема культуры/ед. времени). Результаты продукции полиоксиалканоатов наиболее перспективными продуцентами представлены в таблице 2.3.

**Таблица 2.3**

**Образование полиоксиалканоатов различными микроорганизмами  
(Lee et al., 1996b)**

| Бактерии                                | ПО ПОА  | Основной источник углерода      | X, г/л | ПОА, г/л | ПОА, в % к АСБ | Продуктивность, г/л/час |
|---|---------|---------------------------------|--------|----------|----------------|-------------------------|
| <i>Alcaligenes eutrophus</i>            | ПОБ     | глюкоза                         | 164.0  | 121.0    | 76.0           | 2.42                    |
| <i>Al.eutrophus</i>                     | ПОБ     | СО <sub>2</sub> +Н <sub>2</sub> | 91.3   | 61.9     | 67.8           | 1.55                    |
| <i>Al. eutrophus</i>                    | ПОБ     | гидролизат тапиоки              | 106.0  | 61.9     | 57.5           | 1.03                    |
| <i>Al. eutrophus</i>                    | ПОБ-ПОВ | глюкоза + пропионат             | 158.0  | 117.0    | 74.0           | 2.55                    |
| <i>Alcaligenes latus</i>                | ПОБ     | сахароза                        | 143.0  | 71.4     | 50.0           | 3.97                    |
| <i>Al. latus</i>                        | ПОБ     | сахароза                        | –      | 16.2     | 50.0           | 2.6                     |
| <i>Azotobacter vinelandii</i>           | ПОБ     | глюкоза                         | 40.1   | 32.0     | 79.8           | 0.68                    |
| <i>Methylobacterium organophilum</i>    | ПОБ     | метанол                         | 250.0  | 130.0    | 52.0           | 1.86                    |
| <i>Chromobacterium violaceum</i>        | ПОВ     | валерат                         | 39.5   | 24.5     | 62.0           | –                       |
| <i>Protomonas extorquens</i>            | ПОБ     | метанол                         | 233    | 149.0    | 64.0           | 0.88                    |
| <i>Pseudomonas oleovorans</i>           | ПОГ-ПОО | н-октан                         | 11.6   | 2.9      | 25.0           | 0.58                    |
| <i>Ps. oleovorans</i>                   | ПОГ-ПОО | н-октан                         | 37.11  | 12.1     | 33.0           | 0.32                    |
| рекомбинант <i>E. coli</i>              | ПОБ     | глюкоза                         | 101.4  | 81.2     | 80.1           | 80.1                    |
| рекомбинант <i>Klebsiella aerogenes</i> | ПОБ     | меласса                         | 37.0   | 24.0     | 65.0           | 65.0                    |

### 2.5.1. Природные штаммы – продуценты ПОА

Первыми в 70-х гг. существенный коммерческий интерес вызвали метилотрофные микроорганизмы в связи с доступностью и относительно низкой ценой метанола.

Принципиальная возможность использования метанола в качестве углеродного субстрата для получения полиоксиалканоатов была продемонстрирована на примере различных микроорганизмов: *Protomonas*, *Methylobacterium*, мутантных штаммов *Ralstonia eutropha*, а также *Pseudomonas denitrificans*. Так, *Methylobacterium extorquens*, выделенный из почвы, синтезирует гомогенный полиоксибутират и его сополимеры с валератом (Bourque et al., 1992), соответственно, на метаноле и смесях метанола с валератом. В режиме с подпиткой субстратом на комплексном азотном источнике (с добавками рыбного экстракта), при контролируемой ЭВМ подаче метанола в культуру, скорость образования ПОА достигает 1.7 г/л ч; включение валерата в полимер может составлять до 20 мол. %. Другой изолят, *M. extorquens* sp. КСТС0048, помимо сополимеров 3-ПОБ-со-3-ПОВ, способен аккумулировать сополимеры 3-ПОБ-со-4-ПОБ при различном соотношении фракций 3-ПОВ и 4-ПОБ (Kang et al., 1993). К продукции ПОБ на метаноле при лимитировании роста азотом, а также магнием или фосфатом, способен факультативный метилотроф *Pseudomonas* 135 (Daniel et al., 1992); мутантный штамм *R. eutropha*, аккумулирующий ПОБ и ПОБ-со-ПОВ в периодической культуре при лимите азота (Alderete et al., 1993; Park, Damodaran, 1994), в т. ч. на средах с этанолом и пропанолом.

Детальное изучение метилотрофных организмов показало, что они не отвечают всем необходимым критериям, так как выходы полимера у метилотрофов недостаточно высокие (50–60 % к АСБ), а синтезируемый полимер характеризуется низкой молекулярной массой (40 000–60 000 Da). Затраты субстрата на образование полимера высоки (экономический коэффициент образования ПОА на метаноле,  $Y$ , г/г, 0.18–0.20).

*Azotobacter* был следующим микроорганизмом, рассматриваемым в качестве потенциального продуцента ПОА. Интересен в этом плане организм *Azotobacter vinelandii* UW, синтезирующий полиоксибутират на доступных углеродных субстратах (Page, Knops, 1989). Обнаружив очень низкий уровень НАДН оксидазной активности в выделенном организме, авторы связали эту особенность со способностью организма эффективно синтезировать полиоксибутират с высоким выходом (до 65–75 % к сухому веществу клетки) во время экспоненциального роста, посчитав, что процесс синтеза ПОБ есть один из путей, в котором возможно восстановление НАД. Далее было показано, что синтез ПОБ связан с азотфиксацией (Page, 1992; Page, Cornish, 1993). Авторы показали, что при азотфиксации в штамме

UWD во время истощения азота в ассимиляционных условиях этот процесс зависит от полиоксибутирата, так как последний обеспечивает энергией реакцию нитрогеназы. Добавки в среду рыбного пептона в качестве комплексного источника азота стимулируют высокую скорость синтеза ПОБ на фоне высокого урожая биомассы. Штамм также способен утилизировать мелассу, а при индуцирующих добавках пропионата накапливает сополимеры 3-ПОБ-со-3-ПОВ. Максимум продукции полимера при этом составляет до 1 г/л в час. При росте на среде с валератом в качестве единственного источника углерода уровень 3-ПОВ в полимере достигает 45 мол. %. Однако процесс синтеза полиоксиалканоатов в азотобактере не стабилен и сопровождается накоплением в клетках полисахаридов, что затрудняет процедуру экстракции полимера и отражается на его свойствах. Ряд штаммов *Azotobacter beijerinckii* рассматривают в качестве потенциальных продуцентов ПОА на средах с мелассой, продуктах гидролиза кукурузы и т. п. Возможности оптимизации процесса позволяют надеяться на достаточно продуктивный процесс синтеза полимера при оптимальной концентрации мелассы, равной 65.4 г/л (Purushothaman et al., 2001).

Третьими организмами, вызвавшими интерес, в частности ICI, были хемоорганотрофные водородные бактерии *Ralstonia (Alcaligenes)*, которые синтезировали высокомолекулярный полимер с высокими выходами (до 80 % и выше), используя в качестве источника углерода при автотрофном росте диоксид углерода (в смеси с водородом), а при гетеротрофном – фруктозу. В результате был реализован первый крупномасштабный процесс получения полиоксибутирата на фруктозе при стерильной ферментации в аппарате объемом 200 000 л (Byron, 1987).

Бактерии, относящиеся к таксону *Ralstonia eutropha*, синтезируют полиоксиалканоаты с высокими выходами на минимальной солевой среде при нормальном pH и 30°C, используя в качестве источника углерода углекислоту, а также разнообразную органику, однако из сахаров – только фруктозу. Усиление скорости синтеза ПОА начинается в конце линейной фазы роста бактерий в условиях периодической культуры по мере снижения скорости синтеза белка и достигает максимума на стационарной фазе. Происходит это у *R. eutrophus* при так называемом несбалансированном росте, лимитированном одним из элементов минерального питания (азотом, фосфором, серой и др.). Выходы ПОА, длительность ферментационного цикла на различных субстратах при различных режимах выращивания и продуктивность процесса варьируют в широких пределах, соответственно, 70–87 %, 60–120 час, 0.3–2.42 г/л/час (Byron, 1992; 1994).

В литературе описано много штаммов данного микробного вида. Наиболее изученными и используемыми в качестве продуцента

полиоксибутирата за рубежом является штамм H16 (ATCC 17699), полученный на его основе глюкозоутилизирующий мутант, зарегистрированный в коллекции NCIMB под номером 11599; природные изоляты *R. eutrophus* SH-69, *Alcaligenes* sp. AK201.

В России наиболее изученным является организм *Alcaligenes eutrophus* Z1, выделенный сотрудниками отдела литотрофных культур Института микробиологии РАН под руководством академика Г. А. Заварзина (Савельева, Жилина, 1968) и отселектированный в проточной автотрофной культуре его высокопродуктивный вариант, зарегистрированный в Российской коллекции промышленных продуцентов как *A. eutrophus* B5786 (Сташишина, Волова, 1996). Процесс культивирования бактерий реализуется в автотрофных условиях на минеральной солевой среде с использованием в качестве источника углерода и энергии двуокиси углерода и водорода в периодическом режиме в лабораторных аппаратах объемом от 10 до 30 л, оснащенных в качестве перемешивающего устройства турбинной мешалкой открытого типа с частотой 1000 об/мин. Объемный коэффициент массопереноса по кислороду ( $K_L a$ ) составляет порядка 450–600 ч<sup>-1</sup>. Газовая смесь подается в культуру компрессором мембранного типа с расходом 8–12 л/мин. Соотношение компонентов в газовой смеси для CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> поддерживается близким 1:2:6 по объему (Волова с соавт., 1992).

В связи с тем, что аккумуляция полиоксиалканоатов у подавляющего количества микроорганизмов (за исключением *Alcaligenes latus*) наиболее активно происходит при несбалансированном росте, вызванном дефицитом одного из биогенных элементов (азот, фосфор, кислород), основной проблемой в ходе создания технологии становится нахождение условий, позволяющих получать одновременно высокие выходы полимера и достаточно высокие выходы биомассы. Как правило, для этого предлагаются периодические двухстадийные процессы, включающие наращивание биомассы на первом этапе при оптимальных условиях культивирования и синтез собственно полимера в неоптимальных условиях – на втором, например, на безазотной среде. Разработанный режим, включающий культивирование бактерий на первом этапе при определенном уровне дефицита азота, позволяет в ходе его накопить достаточную биомассу с определенным уровнем полимера и существенно сократить время второй стадии на безазотной среде (Волова с соавт., 1990; 1992; Волова и Калачева, 1996).

Основные кинетические параметры культуры *Ralstonia eutropha* в автотрофном режиме биосинтеза полиоксибутирата представлены на рис. 2.6. На первом этапе (30–35 ч.) в растущей и лимитированной по азоту культуре (подача азота составляла 50 % от физиологической потребности клеток) происходит наращивание биомассы до

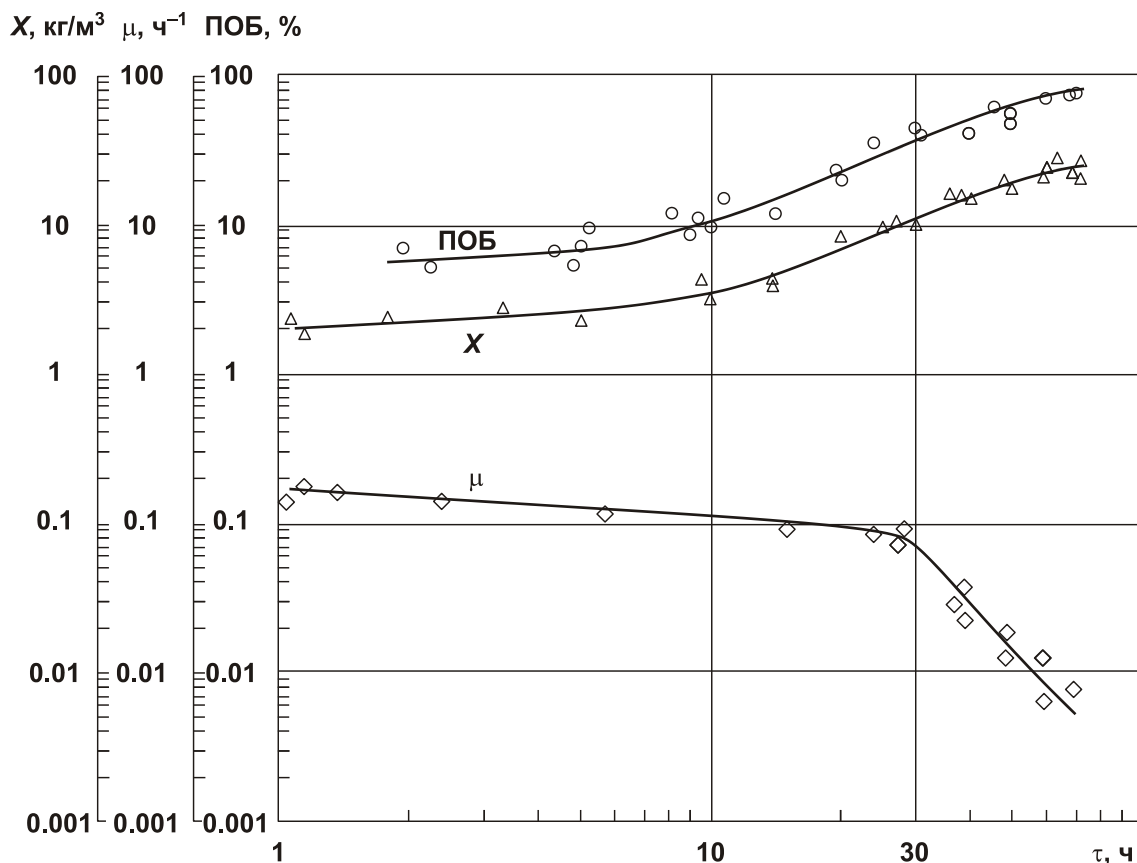


Рис. 2.6. Динамика урожая  $X$ , концентрации полиоксибутирата и удельной скорости роста  $\mu$  автотрофной культуры *R. eutropha* В 5786 (Волова с соавт., 1992).

10–12 кг/м<sup>3</sup> на фоне постепенного снижения удельной скорости роста бактерий (от 0,15–0,17 до 0,08–0,1 ч.<sup>-1</sup>) по мере увеличения концентрации клеток в культуре. Содержание полимера в биомассе к концу этапа составляет, как правило, 45–50 %. В течение второй стадии культивирования, реализуемой без подачи азота, концентрация полимера в клетках возрастает до максимальных значений (80 ± 5 %). Повышение величины  $X$  в этот период отражает главным образом увеличение массы полимера в биомассе, а не прирост бактериальной биомассы, т. к. процессы роста и деления собственно клеток, не получающих азота, практически прекращаются.

Данный режим позволяет в течение 60–70 ч. получать высокие выходы полимера при общей концентрации биомассы до 25–30 кг/м<sup>3</sup>, что сопоставимо с известными зарубежными решениями синтеза ПОА на водороде в биореакторах с близкими массообменными характеристиками.

В ходе ведения процесса синтеза полиоксибутирата и анализа физиологических параметров культуры выявлено возникновение размерной гетерогенности в бактериальной популяции, аккумулирующей ПОБ, усиливающиеся по мере увеличения внутриклеточной концентрации полимера. Электронномикроскопическими исследова-



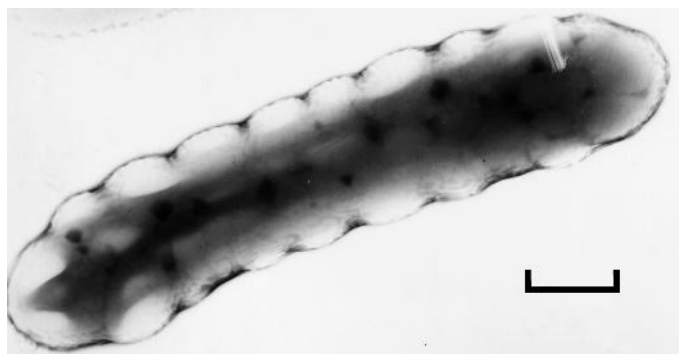


Рис. 2.7. Клетка *Ralstonia eutropha* В 5786 в периодической культуре в стадии максимальной аккумуляции ПОБ (свыше 85 %). Маркер 0.2 мкм (Волова с соавт., 1996б).

ниями показана связь между фазой роста, длиной клеток и гранулообразованием, и внутриклеточным пулом ПОБ (Волова с соавт., 1996б). Установлено, что состояние клеток с максимальными (свыше 70 %) запасами полимера и утратившими способность к синтезу азотсодержащих компонентов и делению, является обратимым в результате эндогенной деструкции и утилизации полимера (Волова с соавт., 1996д).

При изучении физиологической роли полиоксибутирата проанализированы закономерности внутриклеточной деградации полимера (Волова с соавт., 1999) и установлено его участие в процессах репарации клеток в экстремальных условиях роста. Показано, что внутриклеточный пул ПОБ (свыше 40 %) обеспечивает клеткам возможность для роста при неоптимальных значениях pH и температуры среды со значениями удельной скорости роста, в 2.0–2.5 превышающими таковую у клеток, не содержащих ПОБ, а также рост без экзогенного источника углерода и энергии (Волова с соавт., 1996д).

Исследованы кинетические параметры культуры водород-окисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* (рис. 2.7) в режиме автотрофного биосинтеза полиоксибутирата на газовом субстрате; определены удельная скорость потребления субстрата, физические свойства культуральной среды, коэффициенты тепло- и массоотдачи, позволяющие реализовать управление и оптимизацию процесса в условиях инженерной практики (Volova, Voinov, 2003).

Замена газового субстрата органическими источниками углерода (ацетатом, фруктозой, глицерином и др.) позволяет увеличить урожай бактерий и сократить время ферментации при сохранении максимальных выходов полимера (Волова с соавт., 1990; 1992). Для расширения сырьевой базы биотехнологии ПОА и возможности привлечения продуктов переработки природного углеродсодержащего сырья (низкосортных бурых углей, гидролизного лигнина и пр.) и в связи с уникальным физиологическим свойством данного штамма – СО-резистентностью, исследована возможность синтеза полиоксиданов в присутствии монооксида углерода как компонента синтез-газа, получаемого газификацией углеродсодержащего сырья. Исследованы закономерности накопления ПОА в условиях одновре-

менного воздействия двух факторов: ограничения роста бактерий дефицитом азота (фактор, стимулирующий накопление полимеров) и ингибирования CO (компонент синтез-газа). У данного штамма на модельных газовых смесях в диапазоне концентрации CO 5–20% об. под воздействием ингибитора не отмечено подавления активностей ключевых ферментов синтеза полиоксиалканоатов ( $\beta$ -кетотиолазы, ацетоацетил\_КоА-редуктазы, бутиратдегидрогеназы и синтазы), накопление полимера при этом достигает 70–75% (к абсолютно сухому веществу) без существенного изменения затрат газового субстрата. Хромато-масс-спектральный анализ показал, что синтезируемый полимер является сополимером, в котором доминирует поли- $\beta$ -оксибутират (ПОБ) (свыше 99 мол. %) со следовыми включениями  $\beta$ -оксивалерата. Полимер по изученным свойствам (молекулярный вес, кристалличность, температурные характеристики) не отличается от ранее полученного на водороде электролизного происхождения (Волова с соавт., 2002; Volova et al., 2002). Эти результаты составили основу для проведения оптимизации процесса газификации бурых углей с целью получения газового сырья для синтеза ПОА (Щипко с соавт., 2003) и разработки способа синтеза полимеров на продуктах газификации углей (Волова с соавт., 2003).

Среди изучаемых организмов известны штаммы, синтезирующие сополимеры 3- и 4-оксибутирата, а также продуценты сополимеров оксибутирата и оксивалерата. Одни из них накапливают сополимерный ПОА при лимитировании роста фосфором на глюкозе с добавками пропионовой кислоты, при этом доля оксивалерата в полимере контролируется величиной добавки пропионата и может составлять до 30–50% (Holmes, 1985; Byron, 1992). У других высокий уровень оксивалерата в полимере (до 90 мол. %) достигается при культивировании бактерий на смесях масляной и валериановой кислот, этаноле и валериановой или пентановой кислоте как единственном источнике углерода (Doi, 1990; Kim et al., 1994b; Park, Damodaran, 1994; Koyama N., Doi Y., 1995). Эти процессы с использованием дорогостоящих субстратов не рассматривают в качестве возможных для промышленной реализации. Однако штамм (*A. eutrophus* B5786) способен синтезировать сополимеры оксибутирата с различным включением оксивалерата (от 0.5 до 80 мол. %) при автотрофном росте на смесях углекислоты и водорода при небольших (1–2 г/л) добавках валерата в среду (Волова и др., 1992; 1998).

Бактерии *R. eutrophus*, помимо полиоксибутирата (ПОБ) и сополимеров оксибутирата-со-оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ) (Steinbüchel, Valentin, 1995; Волова с соавт., 1996a), способны синтезировать сополимеры (3-оксибутирата) и (4-оксибутирата) – (3ПОБ-со-4ПОБ) (Saito et al., 1996); трехкомпонентные полимеры – поли (3-ПОБ-со-3-ПОВ-со-5-ПОВ) и (3-ПОБ-со-4ПОБ-со-3ПОВ) (Steinbüchel, Valentin,

1995) и (ЗПОБ-со-ЗПОБ-ЗПОГ) (Волова с соавт., 1998). Показана также возможность синтеза гомополимера 4- оксимасляной кислоты – (4ПОБ) на смесях 4-оксимасляной кислоты и цитрата, однако при крайне низком выходе полимера (2 % от АСБ) (Nakamura et al., 1992).

Способность организма синтезировать различные сополимеры вызывает большой интерес в связи с возможностью направленного получения полимеров с заданными свойствами. Поэтому данным исследованиям уделено особое место. Первые исследования по включению 3-ПОБ мономерных единиц в ПОА показали, что оксивалерат может образовываться при конденсации пропионил-КоА с ацетил-КоА при участии кетотиолазы. Различное соотношение ацетата и пропионата в среде как субстрата для роста *Ralstonia* обеспечивает включение мономеров оксивалерата до 50 % от веса сухого вещества клеток.

С использованием источников углерода, меченых по  $^{13}\text{C}$ , установлено, что в образовании поли(3-ПОБ-со-3-ПОВ) сополимеров участвуют 3-кетотиацил-КоА тиолаза, ацетацетил-КоА редуктаза и ПОБ-полимераза. Когда единственным источником углерода служит валерат, у штамма NCIMB 11599 включение поли(3-оксивалерата) достигает в полимере 85 мол. %. При использовании смеси 5-хлорвалерата и валерата количество синтезируемого трехкомпонентного полимера поли(3-ОБ-со-3-ОВ-со-5-ОБ) достигает 46 % к АСБ, при доле 5-ПОВ, равной 52 % (Doi, 1990; 1995). При использовании в качестве источника углерода смеси масляной и пентановой кислот у штаммов NCIMB 11599 и H16 включение валерата в виде ЗПОВ достигает, соответственно, 90 и 75 мол. %. Жирные кислоты конвертируют в сополимер (3-ПОБ-со-3-ПОВ) без обязательной полной деградации до ацетил-КоА и пропионил-КоА. При этом (S)-3-гидроксиацил-КоА или 3-кетоацил-КоА непосредственно превращаются в мономеры. Замечено, что этот путь реализуется в присутствии азотного источника в отличие от превращений фруктозы (Doi et al., 1988).

*R. eutropha* H16 синтезирует сополимеры 3- и 4-оксибутирата на смесях бутирата и 4-оксимасляной кислоты, а также в присутствии 4-хлорбутирата, 1,4-бутандиола или бутуролактона (Kunioka et al., 1989a) Выход полимера достигает 40 % от веса сухой биомассы при доле включения (4-ПОБ) до 37 %. Процесс, тем не менее, вызывает интерес, т. к. увеличение доли данного включения влияет на свойства полимера, снижая температуру плавления и степень кристалличности (Kunioka et al., 1989b), существенно повышая при этом скорость деградации. Известны мутантные штаммы, способные накапливать полимеры с высокими включениями 3-ПОВ и 4-ПОБ, до 96 и 84 %, соответственно, однако при крайне низком общем выходе полимера (Kitamura, Doi, 1994).

Штамм *Alcaligenes* sp. AK201 образует сополимеры оксибутирата и оксивалерата, используя для роста жирные кислоты с различной

длиной углеродной цепи, от C<sub>2</sub> до C<sub>22</sub>. Выход полимера составляет до 50 % от АСБ, при этом его молекулярный вес зависит от длины углеродной цепи исходной кислоты. Максимальные значения (до 1 000 000 Da) соответствуют росту на C<sub>7-9</sub> и C<sub>13-16</sub> жирных кислотах (Akiyama et al., 1992). Оптимизация процесса с использованием в качестве субстрата пальмового масла повысила выход полимера до 60%. Проблема достижения высокого общего выхода полимера со значительными включениями валерата связана с тем, что индукторы синтеза оксибутирата короткоцепочечные жирные кислоты (пропионат и валериат), токсичны для продуцента. Поэтому выходом из этой ситуации может стать как оптимизация самого процесса ферментации за счет изменения режима дозирования индуктора (жирных кислот), а также поиск и использование новых микроорганизмов.

С целью нахождения условий для синтеза сополимеров оксибутирата с оксивалератом и определения влияния режима углеродного питания бактерий на состав образуемых полимеров на примере нескольких штаммов проведено сравнительное исследование органических углеродных субстратов (ацетата, фруктозы и др.) и ко-субстратов (жирных кислот – масляной, пропионовой, пентановой) (Волова с соавт., 1992). Были взяты водородные бактерии *Alcaligenes eutrophys* Z1 и В 5786, а также быстрорастущая карбоксидобактерия *Seliberia carboxydohydrogena* Z 1062, для которой была выявлена способность к синтезу полиоксибутирата (Волова с соавт., 1994б). Органотрофное культивирование бактерий сопровождалось по сравнению с автотрофными условиями биосинтеза более высокими урожаями клеток (на 20–25 %) и вследствие более быстрого роста более ранним (на 6–10 ч) наступлением стационарной фазы (фазы максимального содержания полимера в биомассе). Все штаммы показали способность утилизировать масляную, пропионовую и пентановую кислоты. Две последние, как известно, являются индуктором для синтеза мономеров оксивалерата (Steinbüchel and Schübert, 1989). При внесении небольших добавок (1-2 г/л) данных кислот в культуру бактерий, находящуюся в условиях накопления полимера, зарегистрирована способность всех штаммов включать мономеры оксивалерата в полимерную цепь оксибутирата (таблица 2.4). Однако выходы полимера и соотношение мономеров в нем было различным. Общий выход полимеров по величине был сопоставим у двух штаммов *R. eutropha* и существенно ниже у карбоксидобактерии. Последняя, однако, показала наибольшую способность включать в сополимер оксивалерат. При равных условиях культивирования содержание оксивалерата в полимере, синтезированном штаммом Z1062, было самым высоким.

**Таблица 2.4**

**Состав ПОА, синтезируемых водородокисляющими бактериями  
на смешанном углеродном субстрате (Волова с соавт., 1992)**

| Штамм | Источник углерода          | Содержание<br>ПОА в клетках<br>(%) | Состав ПОА (мол. %) |      |
|-------|----------------------------|------------------------------------|---------------------|------|
|       |                            |                                    | 3-ОБ                | 3-ОВ |
| Z1    | CO <sub>2</sub>            | 69                                 | 100                 | –    |
|       | ацетат                     | 68                                 | 100                 | –    |
|       | фруктоза                   | 72                                 | 100                 | –    |
|       | CO <sub>2</sub> +пропионат | 78                                 | 95                  | 5    |
|       | CO <sub>2</sub> +валерат   | 67                                 | 97                  | 3    |
|       | фруктоза+пропионат         | 74                                 | 83                  | 21   |
|       | ацетат+пропионат           | 69                                 | 80                  | 20   |
|       | ацетат+валерат             | 69                                 | 92                  | 8    |
| B5786 | CO <sub>2</sub>            | 78                                 | 100                 | –    |
|       | ацетат                     | 68                                 | 100                 | –    |
|       | фруктоза                   | 82                                 | 100                 | –    |
|       | глицерин                   | 75                                 | 100                 | –    |
|       | CO <sub>2</sub> +пропионат | 78                                 | 85                  | 15   |
|       | CO <sub>2</sub> +валерат   | 67                                 | 92                  | 18   |
|       | фруктоза+пропионат         | 72                                 | 79                  | 21   |
|       | ацетат+пропионат           | 79                                 | 80                  | 20   |
| Z1062 | ацетат+валерат             | 70                                 | 88                  | 12   |
|       | CO <sub>2</sub>            | 24                                 | 100                 | –    |
|       | ацетат                     | 27                                 | 100                 | –    |
|       | CO <sub>2</sub> +валерат   | 32                                 | 76                  | 24   |
|       | ацетат+валерат             | 29                                 | 68                  | 32   |

В процессе исследования биосинтеза сополимерных ПОА было обнаружено, что скорости синтеза оксibuтирата и оксивалерата различны, и динамика накопления полимера в клетках не совпадает со скоростью включения в него оксивалерата. Оказалось, что максимальное содержание оксивалерата в полимере фиксируется спустя 8-10 ч после добавки пропионата или валерата в культуру. Далее доля данной фракции в сополимере падает на фоне повышения общего пула полимера и содержания в нем оксibuтирата (рис. 2.8).

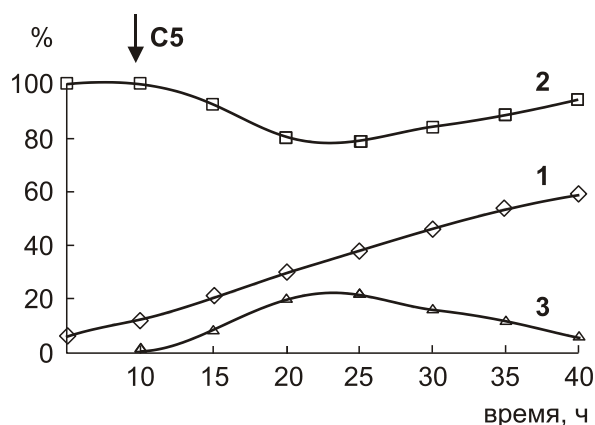


Рис. 2.8. Динамика накопления полимера (1) в *R. eutropha* B 5786 и соотношения фракций оксibuтирата (2) и оксивалерата (3) в нем после подачи пентановой кислоты в культуру на 10 ч (Volova et al., 2002).

Установление данного факта нестабильности фракционного состава сополимеров оксибутирата побудило детально исследовать процесс с целью нахождения условий для регулируемого включения оксивалерата в полимер. С учетом токсичности более высоких концентраций (свыше 2–3 г/л) оксивалерата для культуры был принят иной режим культивирования, в ходе которого сочетанием количества добавок валерата в культуру (1, 2, 3 и более) и последующего времени культивирования удалось разработать режимы биосинтеза, при которых обеспечивается синтез сополимера с варьированием соотношения мономеров оксибутират/оксивалерат в широких пределах, от 9:1 до 1:9 (мол. %) (Волова с соавт., 1996е). Однако для получения сополимера с более высоким содержанием оксивалерата, как правило, приходится жертвовать общим выходом биомассы.

Следующим был вопрос о возможности синтеза водородокисляющими бактериями трехкомпонентных полиоксиалканоатов, содержащих в своем составе, помимо оксибутирата и оксивалерата, мономеры с более длинной углеродной цепью.

Для выявления способности бактерий *R. eutropha* B5786 и *S. carboxydohydrogena* Z1062 синтезировать одновременно коротко- и среднецепочечные ПОА бактерии культивировали на смешанном углеродном субстрате, содержащем углекислоту (или фруктозу) и добавки углеводородных кислот. В качестве индуктора синтеза гетерополимерных ПОА исследованы гексановая, гептановая, октановая, нонановая кислоты и их соли. Установлено, что оба штамма утилизируют данные соединения в качестве источника углеродного питания. Практически сразу после внесения в культуру кислот бактерии начинали их утилизацию. Спустя 1.5–2.0 часа остаточная концентрация кислот в культуральной среде падала в 2–3 раза от исходной, а спустя 4–5 часов – до следовых концентраций. Определены предельно допустимые для роста бактерий концентрации данных кислот в среде вследствие их токсичности. Доза одноразовых добавок углеводородных кислот в культуру не должна превышать 0.5–0.7 г/л.

Далее проведена серия экспериментов в режиме периодической ферментации, в ходе которой в растущую при дефиците азота автотрофную культуру (обычно через 10–15 час. от начала ферментации), аккумулирующую полимер, вносили добавку одной из углеводородных кислот или ее соль; ферментацию продолжали в течение 15–25 час. В ходе экспериментов перед добавкой кислоты, спустя 30 мин. и далее через 1–2 часа производили отбор проб для определения концентрации биомассы в культуре, общего содержания полимера в клетках и его состава, а также остаточной концентрации углеводородной кислоты.

Ферментация бактерий на смешанном углеродном субстрате сопровождалась накоплением в клетках полиоксиалканоатов, кон-

центрация и состав которых имели различные значения в зависимости от условий эксперимента. Оба штамма показали способность к синтезу трехкомпонентных полимеров (рис.2.9–2.10) (Волова с соавт., 1996 в; 1998).

Обе культуры, независимо от типа используемой углеводородной кислоты, как с четным, так и нечетным числом атомов углерода в цепи, синтезировали в качестве доминирующего компонента ПОА оксимасляную кислоту, и включали в качестве сополимеров только оксивалерат и оксигексаноат. Однако соотношение сополимеров в ПОА и их концентрация в клетках у двух культур в аналогичных условиях роста и углеродного питания были различными.

У водородных бактерий при использовании ими в качестве дополнительного углеродного питания кислот с нечетным числом атомов углерода ( $C_7$  и  $C_9$ ) в составе ПОА практически всегда обнаруживали включения оксивалерата, однако его доля в гетерополимере с увеличением длины углеродной цепи у добавок падала. Так, при внесении в культуру в качестве добавки гептановой кислоты доля оксивалерата достигала 10–15 мол. % и выше, а при использовании нонановой кислоты – ниже на порядок. Помимо оксибутирата и оксивалерата в составе гетерополимеров, синтезируемых данным штаммом при росте на гептановой или нонановой кислотах, обнаруживали также в небольших концентрациях включения оксигексаноата, однако эти включения не носили регулярного характера. При использовании водородными бактериями в качестве добавок кислот с четным числом атомов углерода ( $C_6$ ,  $C_8$  и  $C_{10}$ ) в составе ПОА с большей регулярностью обнаруживали включения оксигексаноата и нерегулярные включения оксивалерата. Доля данных включений, однако, не превышала 1–2 мол. %, следовательно, их можно классифицировать в качестве минорных. Спорадически в отдельных экспериментах у водородных бактерий при наличии в среде октановой кислоты наблюдали включение в качестве сополимера оксиоктаноата, при этом его доля в ПОА составляла, как правило, менее 1 мол. %.

Карбоксидобактерии, в отличие от водородных бактерий (рис. 2.10), при росте с аналогичными добавками углеводородных кислот оксивалерат в ПОА в заметных количествах включали не всегда, а, как правило, только при росте на углеводородных кислотах с нечетным числом атомов углерода в углеродной цепи и его доля была невысокой, единицы и десятые доли мол. %. Включение оксигексаноата, однако, в этом случае было более выраженным, его доля в ПОА достигала в отдельных экспериментах 20 мол. % и более, однако включения оксиоктаноата в состав ПОА у карбоксидобактерий в описываемых экспериментах не отмечено. Все это позволяет говорить о специфичности микробного метаболизма углеводородных субстратов и метаболизма ПОА.

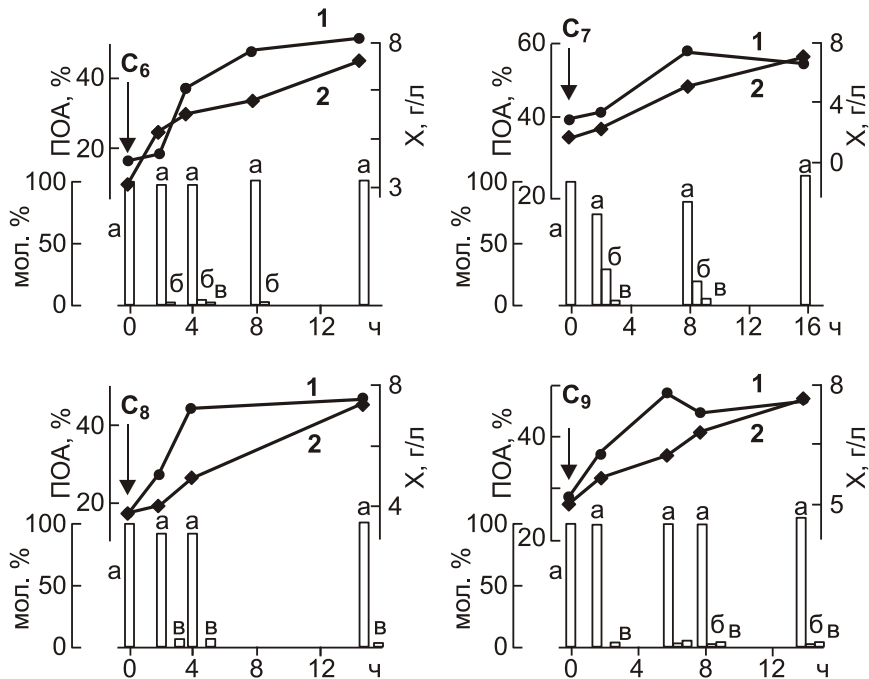


Рис. 2.9. Динамика образования трехкомпонентных ПОА бактериями *R. eutropha* В 5786: концентрация в культуре полимера в % (1), биомассы в г/л (2); а, б, в – сополимеры, соответственно, 3-оксибутират, 3-оксивалерат и 3-оксигексаноат (Волова с соавт., 1998).

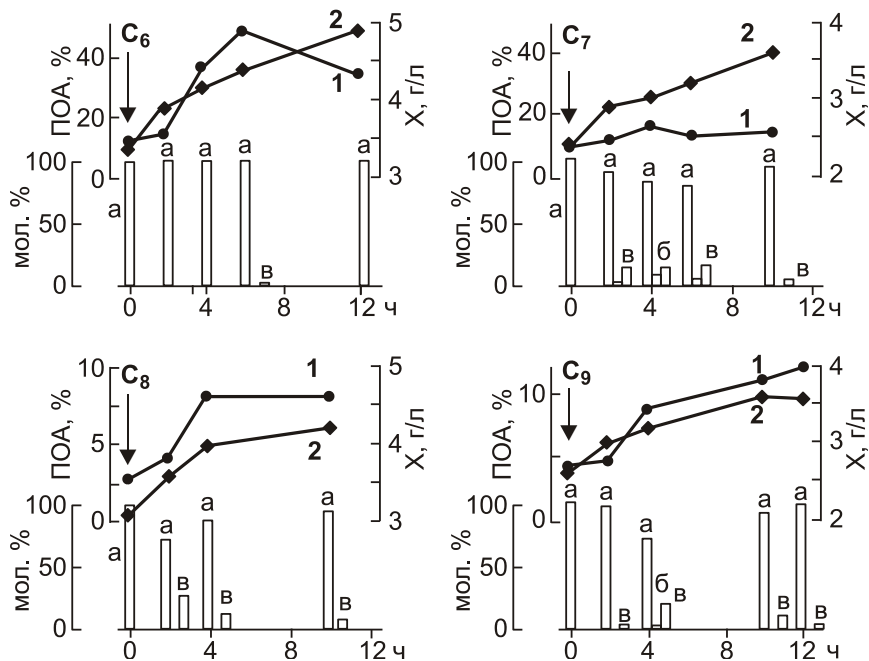


Рис. 2.10. Динамика образования трехкомпонентных ПОА бактериями *S. carboxydhydrogena* Z1062: концентрация в культуре полимера в % (1), биомассы в г/л (2); а, б, в – сополимеры, соответственно, 3-оксибутират, 3-оксивалерат и оксигексаноат (Волова с соавт., 1998).



Отмечена выраженная нестабильность включений оксивалерата и оксигексаноата в ПОА. Это проявлялось в непостоянстве химического состава гетерополимеров в ходе их аккумуляции клетками при росте на смешанном углеродном субстрате. Включения оксивалерата и оксигексаноата выявляли в ПОА уже через 1.0–1.5 часа после внесения добавки кислоты в культуру; далее в течение некоторого времени (обычно 4–6 часов) при последующей ферментации доля этих компонентов в гетерополимере обычно возрастала на фоне общего накопления ПОА в клетках и снижения доли оксибутирата. Однако при продолжении ферментации в последующие часы содержание оксивалерата и оксигексаноата в ПОА снижалось на фоне возрастания доли оксибутирата и продолжающегося увеличения суммарного содержания полимера в клетках. Обычно спустя 10–15 часов после внесения добавки-индуктора в среду данные включения в полимере не обнаруживали, несмотря на увеличение общего содержания гетерополимера в клетках. Аналогичная картина обнаружена нами ранее при образовании водородными бактериями и карбоксидобактериями сополимеров оксибутирата и оксивалерата. Таким образом, время максимального накопления полимера в клетках в целом не совпадает у водородных бактерий и карбоксидобактерий с максимумом включения в ПОА сополимеров оксивалерата и оксигексаноата. Это существенное обстоятельство следует учитывать при исследовании процесса образования гетерополимерных полиоксиалканоатов.

В серии экспериментов при варьировании количества добавок кислот (одна, две, три) и последующего после добавки времени ферментации (от 4–6 до 20–30 часов) реализованы режимы ферментации, позволяющие получать сополимеры с различным соотношением оксибутирата, оксивалерата и оксигексаноата. Это позволяет стабильно получать трехкомпонентные образцы полиоксиалканоатов, однако включения оксигексаноата не превышают 2–3 мол. % у штамма В 5786. У штамма Z 1062 включения оксигексаноата на порядок выше, однако вследствие более низких общих выходов полимера использование его в качестве продуцента представляется проблематичным (Волова с соавт., 1998).

Мутантные штаммы *R. eutropha*, утилизирующие в качестве источника углерода глюкозу, способны обеспечивать высокие урожаи при содержании полимера до 80 % и выше, в т. ч. в условиях двухступенчатой культуры, когда на первом этапе с целью накопления биомассы организм выращивают в проточном режиме при избытке азота и лимите глюкозы; на втором – при лимите азота с постепенным снижением его концентрации. Продуктивность культуры по полимеру составляет 1.23 г/л ч.; содержание ПОБ – 72.1 % (Du et al., 2001).

Альтернативой параметрически управляемому подходу может стать использование для синтеза сополимеров ауксотрофных мутантных штаммов – продуцентов аминокислот (Madison, Huisman, 1999). Как известно, пропионил-КоА является интермедиатом деградационного пути треонина, валина и изолейцина. Мутантные штаммы с дефектами данного пути идентифицированы недавно как продуценты сополимеров (3-ПОБ-со-3-ПОВ). Так, штамм *R. eutropha* является прототрофным ревертантом изолейцинового ауксотрофного штамма *R. eutropha* H16 и способен аккумулировать 3-ПОБ-со-3-ПОВ с 7 % включением валерата на средах с фруктозой, глюконатом, сукцинатом, ацетатом и лактатом. Компенсируя дефектную треониндегидрогеназу, штамм суперпродуцирует ацетолактатсинтазу и секретирует валин, а также лейцин и изолейцин. При лимите азота, однако, происходит сверхсинтез промежуточных продуктов синтеза процессов данных аминокислот – 2-кето-3-изовалерата и 2-кето-3-метилвалерата, и последующая деградация их до пропионил-КоА интермедиатов. Добавление треонина, изолейцина и валина в культуру *R. eutropha* SH-69 обеспечивает включение валерата в полимер, соответственно, до 53, 41 и 15 %. Валин и изолейцин, в отличие от треонина, не токсичны для культуры, их концентрация может составлять до 50 мМ. Когда концентрация аминокислот достигает 10 мМ, фракция оксивалерата в полимере достигает концентрации аминокислот. Штамм *R. eutropha* NCIMB 11599, напротив, не включает валерат при добавках треонина и включает только до 2% от изолейцина или валина (Yoon et al., 1995). При ресуспендировании штамма *R. eutropha* H16 в среде с треонином в качестве источника углерода при лимите ионов натрия или кислорода синтезируется около 6 % ПОА с 5 % включением валерата (Nakamura et al., 1992).

Эти эксперименты говорят о больших перспективах использования метаболической инженерии для получения суперпродуцентов различных по составу и структуре ПОА. Например, использование хорошо изученных и применяемых в промышленных масштабах ауксотрофных мутантных штаммов *E. coli* – суперпродуцентов аминокислот (Debabov et al., 1998), при комбинировании в них метаболических путей синтеза аминокислот с путями синтеза ПОА обещает колоссальные перспективы для успешного и экономически приемлемого производства сополимеров.

*Alcaligenes latus* также считается перспективным продуцентом полиоксиалканоатов, но в отличие от *R. eutrophus* этот организм характеризуется способностью синтезировать полиоксиалканоаты при продуктивном росте без каких-либо ограничений компонентами среды (Hangii, 1990; Hrabak, 1992). В связи с тем, что аккумуляция полиоксиалканоатов у данного микроорганизма осуществляется при высоких значениях скорости роста, его выращивание проводят в одну

стадию или в проточном режиме при наиболее высоких из известных в настоящее время значениях продукции (за 18 часов ферментации урожай и концентрация полимера в культуре достигают, соответственно, 142 и 68 г/л. Однако недостаточно высокие выходы ПОА (около 50 % к АСБ) ухудшают общие показатели (Yamane et al., 1996a, b). В качестве источника углерода организм утилизирует сахарозу, поэтому для его выращивания приемлемы сахаросодержащие отходы ряда производств меласса, тростниковый сахар и др.). Помимо ПОБ, организм синтезирует сополимеры (3-ПОБ-со-3ПОВ) на смешанном углеродном субстрате, содержащем сахарозу и добавки валерата или пропионата (Ramsey et al., 1990a; Chen et al., 1991), включение оксивалерата в полимере достигает 45 мол.%; в полимере присутствуют также сополимеры 3- и 4-оксибутирата в одностадийном процессе при добавлении в среду с сахарозой  $\beta$ -бутиролактона (Hiramitsu et al., 1993). Последний превращается в 4-ПОБ с высоким уровнем конверсии (до 60 %), что существенно выше по сравнению с *Ralstonia*.

Полиоксиалканоаты необычного состава и с новыми свойствами были обнаружены в бактериях рода *Pseudomonas*. Профессор Витольт в ходе приготовления замораживанием образцов для электронной микроскопии, обнаружил, что включения *Ps. oleovorans* при росте на 50 % октане имеют другую конфигурацию по сравнению с ПОБ (De Smet et al., 1983). Химический анализ показал, что включения состоят на 89 % из 3-оксиоктаноата, остальные 11 % являются 3-оксигексаноатом (Lageveen et al., 1988).

Вскоре было установлено, что микроорганизмы, относящиеся к роду *Pseudomonas*, способны аккумулировать различные по составу полимеры, содержащие мономерные единицы с длиной углеродной цепи от  $C_4$  до  $C_{12}$  при росте на *n*-алканах, *n*-алканоатах, *n*-алкенах и *n*-спиртах (Huisman et al., 1989; Anderson, Dawes, 1990).

Установлено, что бактерии *Pseudomonas putida* способны синтезировать разнообразные по составу ПОА при росте на глюкозе. В гетерополимерных ПОА идентифицированы: 3-оксидеканоат (в качестве доминирующего мономера), а также 3-оксигексаноат и 3-оксиоктаноат и другие насыщенные и мононенасыщенные мономеры с длиной цепи  $C_{12}$  и  $C_{14}$  атомов углерода (Huijberts et al., 1992). Активный синтез средне- и длинноцепочечных ПОА в псевдомонадах происходит потому, что длинноцепочечные жирные кислоты, например, ( $C_{18:1}$ ), превращаются в реакциях  $\beta$ -окислительного пути за два оборота цикла в  $C_8$  и  $C_{10}$  мономеры, которые по сравнению с октаноатом легко включаются в ПОА. Олеиновой кислоте, например, для включения в  $C_{10}$  требуется 4 молекулы ацетил-КоА. Эта конверсия эквивалентна 20 молям АТФ на восстановительном этапе, который реализуется в то время, когда выделяющаяся энергия не может дис-

сипировать. Напротив, включение декановой и октановой кислот в длинноцепочечные ПОА эквивалентно 2 молям АТФ. Поэтому урожай полимера на клетку выше при использовании длинноцепочечных жирных кислот.

Далее были обнаружены другие штаммы, способные синтезировать различные по составу средне- и длинноцепочечные полиоксиалканоаты. Был выделен штамм *Pseudomonas sp. A33*, синтезирующий сополимеры 3-гидроксипутирата и еще 9 разнообразных мономеров, включая насыщенный 16-ти углеродный оксигексадеcanoат (0.2 мол %) и три ненасыщенных: 3-оксидодеценоат (21 мол. %), окситетрадеценоат (3.4 мол. %) и 3-оксигексадеценоат (1.4 мол. %) (Lee et al., 1995a). С использованием различной аналитической техники авторы доказали, что это не смеси, а, именно, сополимерные ПОА. Ненасыщенные длинноцепочечные полиоксиалканоаты, как оказалось, продуцирует *Pseudomonas oleovorans* при росте на *n*-октане и 1-октене (De Smet et al., 1983). Эти организмы при росте на смесях 5-фенилвалерата и *n*-нонановой или *n*-октановой кислотам продуцируют два различных по составу длинноцепочечных полимера: один – с соответствующей 3-оксиалканоатовой единицей, другой – с 3-окси-5-фенилвалерат (до 40 мол. % к общей массе полимера). Общий выход ПОА при этом, однако, низок (Kim et al., 1991). При росте организма на цианоундекановой кислоте в составе ПОА идентифицировано до 32 мол.% циано-содержащих мономеров, подобных 9-циано-3-оксинонаноату и 7-циано-3-оксигептаноату (Lenz et al., 1992). *P. oleovorans* синтезирует также полимеры, содержащие в своем составе хлоро- и флюоринсодержащие включения (Abe et al., 1990; Kim et al., 1996); бромоктановые кислоты (Kim et al., 1998) и ПОА, содержащие терминальные эпоксигруппы (Bear et al., 1997).

Исследования закономерностей ферментации *Pseudomonas* с целью продукции полиоксиалканоатов активно проводятся в настоящее время. Установлено, что *P. pseudoflava* растет с хорошими показателями в периодической культуре на глюкозе, ксилозе или арабинозе, синтезируя поли-3-гидроксипутират, а также в хемостате на гидролизатах гемицеллюлоз (Bertrand et al., 1990). *P. pseudoflava* и *P. oleovorans* синтезируют длинноцепочечные ПОА (Ramsay et al., 1991) при росте в хемостатной культуре на октаноате натрия в качестве источника углерода. Показано, что изменением источника углерода и соотношения C/N в среде можно управлять мономерным составом полиоксиалканоатов, синтезируемых *P. putida* KT2442, получая четырех- и шестикомпонентные гетерополимеры при различных уровнях их продукции (Preusting et al., 1992; Huijberts and Egging, 1996).

Таким образом, различные микроорганизмы, *Ralstonia eutrophus*, *A. latus*; *Pseudomonas oleovorans*, *Ps. putida*, *Azotobacter vinelandii* и *Methylobacterium extorquens*, достаточно полно охарак-

теризованные к настоящему времени, являются основой для разработки различных по эффективности способов получения разнообразных полиоксиалканоатов.

Вместе с тем, поиск и выделение новых микроорганизмов, синтезирующих полиоксиалканоаты, продолжается. Сточные воды и промстоки, содержащие в достаточно высоких концентрациях разнообразную углеродсодержащую органику, включая различные жирные кислоты, являются перспективным источником для выделения ПОА-синтезирующих организмов. Среди выделенных организмов, конвертирующих органическое вещество стоков в ПОА, представители различных таксонов: *Sphaerotilus*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Acinobacillus* и др.

Так, изолят *Sphaerolitus natans*, являющийся типичным компонентом активного ила, способен накапливать до 30 % полиоксибутирата к весу сухого вещества клетки, а полученный на его основе мутантный штамм синтезирует до 50–67 % ПОБ (Takeda et al., 1995a,b) и характеризуется высокой (до 6 г/л) толерантностью к пропионату. Это в 6 раз выше по сравнению с *R. eutropha*. Штамм перспективен для синтеза 3-ПОБ-со-3-ПОВ на смесях глюкозы и пропионата. Два штамма *Agrobacterium sp.*, SH-1 и GW-014, выделенные также из активного ила, охарактеризованы как продуценты ПОБ на среде с глюкозой. В зависимости от типа и концентрации углерода, на средах с различными гексозами (сахарозой, глюкозой, фруктозой), выход полимера составляет от 30 до 80 % при возможном включении валерата от 3 до 11 мол. %. На пентозных сахарах (арабинозе или ксилозе) концентрация полимера не выше 35 % при уровне включения валерата от 8 до 11 мол. %. Пропионил-КоА для образования мономеров 3-оксивалерата в данном случае синтезируется из сукцината по метилмалонил-КоА-пути, при этом накопление валерата зависит от концентрации ионов  $Co^{2+}$ , входящих в состав  $B_{12}$ -зависимой метилмалонил-КоА мутазы. В оптимизированной периодической культуре на глюкозо-пропионатной среде выход полимера достигает 75 % при соотношении бутирата и валерата как 1:1 (Lee et al., 1995). Эффективное образование ПОА установлено для анаэробной *Rhodobacter sphaeroides* на средах с отходами производства пальмового масла. В Малайзии отходы данного производства, содержащие органические кислоты, конвертировали в метан, который сбрасывали затем в атмосферу. Комбинирование процессов – анаэробной трансформации отходов в органические кислоты, используемые затем в качестве углеродного субстрата для образования ПОА, может оказаться перспективным (Hassan et al., 1997). Выделенный из почвы штамм *R. sphaeroides*, как установлено, синтезирует ПОА в экспоненциальной фазе роста. Штамм, обладая высокой потребностью в кислороде, способен эффективно усваивать сахара и азотсодержащие компо-

ненты стоков. При уменьшении обеспеченности кислородом штамм эффективно синтезирует ПОА с одновременной очисткой стоков. В связи с тем, что полимер синтезируется в условиях, не требующих лимитирования роста бактерий азотом, процесс весьма эффективен. Урожай биомассы составляет до 4.8 г/л, содержание полимера – 47 % (Son et al., 1996).

### **2.5.2. Генетически модифицированные организмы – продуценты ПОА**

В последние годы в результате достижений в области молекулярно-генетических исследований и детального исследования системы синтеза полиоксиалканоатов появились перспективы для получения рекомбинантных штаммов как более эффективных продуцентов биополимеров. На этом пути, ориентированном на получение высокопродуктивных биосинтетиков полиоксиалканоатов с использованием разнообразных источников углерода, возможны два направления. Первое предполагает интродукцию субстрат-утилизирующих генов в бактериальные штаммы, синтезирующие ПОА для расширения их трофического потенциала. Второе использует гены системы синтеза ПОА для интродукции их в быстрорастущие микроорганизмы, не синтезирующие полиоксиалканоаты, но характеризующиеся широким органотрофным потенциалом. К настоящему моменту гены синтеза ПОА клонированы из нескольких десятков бактерий, что позволило получить разнообразные в таксономическом отношении продуценты полимеров, а также организмы, обладающие способностью синтезировать совершенно новые типы ПОА (Steinbüchel, Valentin, 1995; Braunegg et al., 1998; Madison, Huisman, 1999; Sudech et al., 2001; Steinbüchel, 2001).

#### *Синтез ПОА рекомбинантными бактериями*

К настоящему моменту проведены достаточно широкие исследования, выясняющие характер влияния увеличения копияности генов на процесс образования полиоксиалканоатов микроорганизмами, принадлежащими к различным таксонам. Результаты исследований показали различную эффективность увеличения копияности *phb* или *pha*-генов, контролирующих синтез полиоксиалканоатов, у разных микроорганизмов. Обнаружено, что в ряде случаев увеличение уровня ПОА не связано с высокой копияностью *pha* генов. Эти результаты показали, что система регуляции ПОА-метаболизма многоуровневая. Например, когда *pha* гены из *P. oleovorans* интродуцировали в него же или в *P. putida*, увеличения синтеза ПОА не происходило. Эффект дополнительных копий ПОА-полимеразы экспрессированных генов дал существенные изменения в составе полимера (Huisman et al., 1991) и снижение его молекулярного веса (Huisman et

al., 1991). Продукция полиоксибутирата в ПОб-синтезирующем мутантном организме *Rhizobium meliloty* также только реконструировала дикий тип в то время, как добавление *P. denitrificans phaC* гена приводило к удвоению плазмиды и выхода ПОА по сравнению с уровнем в родительском штамме (Ueda et al., 1996).

Повышение активности ферментов системы синтеза ПОА продемонстрировано при гомологичной амплификации, выполненной с бактериями рода *Alcaligenes*. Когда плазмиду, сконструированную на основе генов синтеза ПОА из *Al.eutrophus*, интродуцировали в этот же организм, активность ПОА-синтазы возрастала, и в результате скорость продукции полимера в культуре стала в 1.24 раза выше по сравнению с родительским штаммом. В массовой периодической культуре штамм также более эффективно синтезировал полимер (Steinbüchel, Valentin, 1995; Park et al., 1995).

Гетерологичная экспрессия ПОА-биосинтетических генов *Al.eutrophus* продемонстрирована в различных микроорганизмах. Когда *phbCAB* оперон из *R. eutropha* был интродуцирован в различные виды бактерий *Pseudomonas*, исходно не синтезирующих короткоцепочечные ПОА, в частности, полиоксибутират, была получена экспрессия генов у *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. oleovorans* и др., и у данных организмов зафиксирован синтез смесей коротко- и среднецепочечных полимеров (Preusting et al., 1993). Вместе с тем, штамм *Pseudomonas stutzeri*, исходно не синтезирующий полиоксибутират, не приобретал способности к его синтезу после интродукции в него генов *R. eutropha* (Steinbüchel, Schübert, 1989). Рекомбинантный штамм *K. aeroginones* с включенными генами из *Al. eutrophus* начал синтезировать полиоксибутират на среде с мелассой. Увеличение синтеза ПОА наблюдали также в *Mycoplana rubra*, трансформированной *pha* генами из *Al.eutrophus*.

При интродукции ПОА-синтетических генов *Thiocapsa pfenningii* в *Ps. putida*, рекомбинантный штамм на среде с октаноатом накапливал полиоксиалканоаты, содержащие 3-оксибутират, 3-оксиоктаноат и 3-оксигексаноат (Madison, Huisman, 1999). Недавно установлено, что штамм *Synechococcus sp.*, содержащий *phb* гены *R. eutropha*, способен синтезировать 3-ПОб с молекулярной массой до 465 000 Da на среде с ацетатом при лимите азота (Takahashi et al., 1998).

Несмотря на эти, вполне обнадеживающие результаты по манипулированию с *phb* генами *R. eutropha*, продолжался поиск более перспективного объекта для создания рекомбинантных продуцентов полиоксиалканоатов. Бактерии рода *Alcaligenes*, хорошо себя зарекомендовавшие в качестве промышленного продуцента ПОА, способны с большими выходами синтезировать разнообразные по составу и свойствам полимеры, имеют, однако, некоторые ограничения. Синтез ПОА у них происходит при низких скоростях роста, что

затрудняет процесс ферментации. Кроме этого, эти микроорганизмы не достаточно полно охарактеризованы генетически, что ограничивает их использование для генно-инженерного манипулирования. Этим проблемам не возникает при рассмотрении быстро растущих и наиболее полно охарактеризованных в генетическом плане бактерий *E. coli*. Сконструированные к настоящему времени рекомбинантные штаммы *E. coli*, содержащие стабильные и высококопийные плазмиды с генами синтеза полиоксиалканоатов из *Al. eutrophus* и других бактерий, характеризуются способностью синтезировать высокие концентрации полимеров различного состава при общей высокой продукционной способности (Peoples et al., 1989; Janes et al., 1990; Kim et al., 1992; Lee et al. 1994a, b, c).

Первые результаты по клонированию *pha* генов *Al. eutrophus* в *E. coli* дали положительные результаты – в трансгенной бактерии зафиксировали образование гранул полиоксибутирата (Schübert et al., 1988; Slater et al., 1988), и организованный процесс получения ПОБ дал хорошие результаты. В периодической pH-статируемой культуре в течение 42 часов был получен выход полимера до 90 г/л (Kim et al., 1992). Коллектив под руководством д-ра Ли за короткий период получил около 10 различных штаммов с включенной *parB* стабильной *phbCAB* плазмидой (Lee et al., 1994a). Один из штаммов *E. coli* В синтезировал на среде с 2 % глюкозы до 76 % ПОБ; другие (*E. coli* W, K-12, EC3132) образовывали от 15 до 33% полимера (к весу сухого вещества). Полученные несколько позже штаммы с высококопийной плазмидой, такие, как *XL1-Blue*, *JM109*, *HB101*, накапливали очень много полимера, до 75–85 % при скорости его синтеза до 2.1 г/л час (Lee et al., 1994b). В среду, при этом, добавляли комплексные источники азота (дрожжевой экстракт, триптон, смесь аминокислот). В рекомбинантном штамме *XL1-Blue* синтез полимера лимитирован НАДН, поэтому добавление аминокислот, а также олеата, обеспечивает синтез ПОБ восстановительными эквивалентами, необходимыми для высокого выхода ПОБ (Lee et al., 1995b). Суперэкспрессия *FtsZ* приводила к существенному повышению продуктивности; рекомбинантный штамм синтезировал до 70 % ПОБ при концентрации клеток в культуре, равной 104 г/л и продукции 2 г/л в час, что, однако, несколько ниже по сравнению с *R. eutropha* (Wang, Lee., 1998).

Одной из ключевых проблем продукции полиоксиалканоатов на основе трансгенных микроорганизмов является стабильность и постоянство экспрессии *phb* генов в новом хозяине. Получение ПОА на основе рекомбинантных организмов часто сопровождается снижением числа плазмиднесущих особей в популяции, а также понижением копийности плазмид в ходе репликации. Это может быть также следствием гибели части клеток, несущих гены устойчивости к антибиотикам, например, *parB*. Нестабильность *phb* генов в высокоплотных



культурах в ходе ферментации, сопровождающаяся падением продукции ПОА, влияет на его стоимость.

Большинство генноинженерных штаммов, применяемых для получения ПОА, растет на глюкозе, цена которой достаточно высока. Расширение трофического потенциала и вытекающая из этого возможность расширения и удешевления сырьевой базы для производства ПОА, чрезвычайно значимы. Однако результаты, полученные в этом направлении, пока не так значительны, как ожидалось. Так, интродукция  $\beta$ -галактозидазного гена и *gal* оперона *E. coli* в *Al. eutrophus* не позволила получить быстрорастущего на лактозе штамма (Pries et al., 1990). В другой работе, полученный рекомбинантный штамм *Al. eutrophus* с встроенными генами из *Bacillus subtilis*, сконструированный с целью продукции ПОА на сахарозе, также характеризовался очень медленным ростом. Сравнительно недавно полученный рекомбинантный штамм на основе *E. coli* и *K. aerogenes*, исходно утилизирующих сахарозу, способен, как оказалось, синтезировать от 45 до 70 % ПОБ при росте на среде с сахарозой (цена которой на 33–50 % ниже стоимости глюкозы) (Zhang et al., 1994). Штамм способен также включать в полимер до 55 % валерата в присутствии в среде пропионата, однако, он также не был достаточно стабильным.

Как было установлено сравнительно недавно, даже незначительное изменение соотношения мономеров в полиоксисалканоатах способно кардинально влиять на их свойства. Поэтому работы по метаболической инженерии ПОА-продуцирующих микроорганизмов, безусловно, не могли обойти этой возможности. В связи с тем, что включение валерата в ПОА, как правило, происходит при индуцирующих добавках в среду пропионата или валериановой кислоты, эта же стратегия была использована в работе с рекомбинантной кишечной палочкой. *E. coli*, как известно, охотно утилизирует пропионовую кислоту, поэтому культуру, растущую на ацетате или смесях глюкозы и пропионата, постепенно адаптировали к этому субстрату небольшими его добавками (Slater et al., 1992). В результате экспрессии конститутивных *ato* оперона и *fad* регулона в клетках *E. coli* происходила полная экспрессия ферментов, катализирующих реакции утилизации жирных кислот. При этом *ato* система обеспечивает транспорт ацетоацетата в клетке, и это приводит к начальной его активации и образованию ацетоацетил-KoA; *atoAD* способна также транспортировать в клетки пропионат; *fad* регулон кодирует ферменты для деградации жирных кислот, включая специфическую тиолазу (Clark, Cronan, 1996). Последняя, в свою очередь, способствует образованию 3-ПОБ в *PhbA*. Фракция валерата в полимере зависит от процентного содержания пропионата в ферментационной среде, однако, не превышает 40 мол. %. В связи с тем, что *E. coli* намного толерантнее к пропиона-

ту по сравнению с *Al. eutrophus*, ферментация такого штамма для получения 3-ПОБ-со-3-ПОВ может оказаться более эффективной. Известны трансгенные штаммы кишечной палочки (*XL1-Blue*, *JM109*, *HB101*), дающие высокие урожаи в плотной культуре при росте на глюкозе и пропионате и включающие до 7 мол. % валерата в ПОА (Yim et al., 1996). При этом установлено, что олеат стимулирует включение оксивалерата. Аналогично *E. coli*, получен рекомбинантный штамм *Klebsiella*, синтезирующий сополимеры оксибутирата с оксивалератом на среде с глюкозой и пропионатом (Zhang et al., 1994). С целью получения сополимеров 4-полиоксибутирата, *hbcT* гены *Clostridium kluyveri*, кодирующие 4-гидроксибутират-КоА трансферазу, интродуцированы в составе *phbC* плазмиды *Al. eutrophus* в *E. coli*. Полученный штамм синтезировал 4-полиоксибутират в присутствии 4-бутирата в среде (Hein et al., 1997), однако, пути в *E. coli*, приводящие к превращению 4-ПОБ в 3-ПОБ, пока не изучены. Трансгенный продуцент сополимеров 3-ПОБ-со-4-ПОБ получен также на основе кишечной палочки при интродукции в нее сукцинат-деградирующего пути из *C. kluyveri* в составе плазмиды, содержащей *phb* гены *Al. eutrophus* (Valentin, Danis, 1997). На среде с 1.5 % 4-гидроксибутирата штамм синтезировал до 46 % сополимера 4-ПОБ-со-3-ПОБ. Экспрессия *phaCl* гена *Ps. oleovorans* получена в рекомбинантном штамме *E. coli*, при этом зарегистрирован 12 % выход ПОА, содержащий включения 3-гидроксигексаноата и 3-гидроксиоктаноата в присутствии в среде жирных кислот (от C<sub>8</sub> до C<sub>18</sub>) (Ren et al., 1996).

В целом полученные результаты в области метаболической инженерии синтеза ПОА обнадеживают и позволяют надеяться на возможность конструирования новых эффективных штаммов для получения биополимеров, обладающих: 1) способностью к быстрому росту в высокоплотных культурах с высокой общей продуктивностью, 2) синтезирующих большие количества полимеров с использованием различных углеродных субстратов, а также 3) облегчающих процедуру экстракции полимера из клеточной биомассы и 4) позволяющих контролировать внутриклеточную деполимеразную систему, деградирующую синтезированный полимер.

#### *Метаболическая инженерия ПОА синтетических путей в высших организмах*

С целью снижения производственной цены и наращивания объемов промышленного производства ПОА в настоящее время рассматриваются проекты возможностей производства на основе высокоурожайных масличных сельскохозяйственных культур, таких как *Brassica*, кукуруза, подсолнечник, накапливающих большие количества жиров. Например, при выходе ПОА в растениях около 30 % можно было бы получить до 350 миллиардов полимера. Потенциально

сельскохозяйственные культуры растений могут оказаться выгодными для получения ПОА (Williams, Peoples, 1996c). В этой связи развернуты исследования по переносу системы синтеза ПОА в дрожжи, высшие растения, клетки насекомых.

В отличие от кишечной палочки, в которую необходима интродукция всей системы синтеза полиоксиалканоатов, для синтеза ПОА в дрожжах нужно экспрессировать только часть этой системы. Так, при интродукции генов ПОБ-полимеразы из *Alcaligenes* в дрожжевые клетки, в последних зарегистрировано образование гранул полиоксибутирата, однако выходы его были низкими, около 0.5 % к весу клеток (Leaf et al., 1996; 1996). Такой низкий уровень биосинтеза ПОБ можно объяснить, видимо, недостаточной активностью эндогенной кетоацил-КоА тиолазы и ацетацетил-КоА редуктазы в дрожжах (соответственно, определены как 150 и 200 нМ/мин./мг). Последующие работы, вероятно, смогут улучшить эти результаты.

Экспрессия *phbC* генов *R. eutropha* в клетках *Trichoplusia* впервые получена с использованием бакуловирусной системы переноса генов. Успешная экспрессия генов получена спустя 60 часов после вирусного заражения; при этом 50 % от общего белка составила ПОБ-деполимераза (Williams et al., 1996a). Другая работа была направлена на получение трансгенных клеток *Spodoptera frugiperda* (гусеница паданицы), в которые интродуцировали синтазу жирных кислот крысы трансфекцией с помощью бакуловирусов (Williams et al., 1996b). Далее, в результате последующей трансфекции в клетки была интродуцирована полимеразы из *R. eutropha*. В результате в клетках насекомых синтезировались гранулы полиоксибутирата, что было подтверждено иммунофлюоресцентным анализом (Joshi, Smith, 1993). Уровень синтеза ПОБ составил около 1 мг/л культуры клеток (0.16 % к весу сухого вещества). Эти результаты показывают принципиальную возможность использования эукариотических ферментов для образования ПОБ-интермедиатов и получения экспрессии *phb* генов в гетерологичном хозяине (Williams et al., 1996b).

Недавно проведены успешные работы по клонированию и экспрессии бактериальных генов синтеза полиоксиалканоатов в высших растениях. Стабильная экспрессия *phb* обеспечила синтез в *Arabidopsis* высокомолекулярного (1 000 000 Da) полиоксибутирата (Poierier et al., 1995). В отличие от бактерий эукариотические клетки характеризуются высокой компартментализацией, и это отражается на количестве экспрессируемых *phb* генов. Данные гены должны соотноситься с растительными клетками, когда концентрация ацетил-КоА – наивысшая, и рост растения не ограничен.

*Arabidopsis* был первой растительной моделью, использованной для изучения возможности гетерологичной экспрессии *phb* генов микроорганизмов. Для синтеза ПОА в растениях необходимо интро-

дуцировать в них только гены, контролирующие синтез редуктазы и ПОА-синтазы, так как кетотиолаза – первый ключевой фермент системы синтеза ПОА, присутствует в цитоплазме клеток высших растений (Poirier et al., 1992). После интродукции в *Arabidopsis thaliana* генов *phbB* и *phbC* из *R. eutropha*, в цитоплазме, ядре и клеточных вакуолях обнаружили синтез гранул полиоксибутирата. Диаметр гранул составлял от 0.2 до 0.5 мкм, однако, суммарная концентрация полимера была низкой, около 100 мг/г сырого веса. Вероятно, в растениях критическим местом для синтеза ПОА является тиолазная активность. Синтез гранул ПОБ в ядре также вредит росту и развитию растения (Poirier et al., 1992).

Более продуктивная трансгенная форма *Arabidopsis thaliana* получена в результате интродукции генов *phbB* и *phbC* из *R. eutropha* в пластиды. В этих органеллах активность ацетил-КоА, необходимой для данного синтеза, существенно выше по сравнению с ядром и вакуолями. В результате продукция ПОБ была существенно выше, до 14 % к весу сухого вещества, и его молекулярная масса достигала 500 000 Da (Nawrath, Poirier, 1996). Этот результат свидетельствует о том, что получение полиоксиалканоатов с использованием высших растений может стать экономически выгодным.

ПОБ-синтезирующая система экспрессирована в культуре клеток кукурузы (сорт Черный мексиканский *Zea mays*). Клетки росли в биореакторе быстрее по сравнению с полностью дифференцированным растением. Тиолазная активность в них стабилизировалась на уровне 0.140 ед./мг, однако редуктазная активность была менее стабильна и падала от 0.64 до 0.12 ед./мг. В молодой культуре *phbB* гены детектировались, однако в процессе культивирования их становилось значительно меньше. В дополнение к нестабильности *phbB* и *phbC* генов трансформированные растительные клетки росли медленнее, чем исходные (Hahn et al., 1997).

Недавно *phb* гены *Alcaligenes* были интродуцированы в *Gossypium hirsutum* и было установлено, что в волокнах хлопчатника происходит синтез полиоксибутирата. Конструкция, содержащая *phbB* и *phbCb* гены, была встроена в клетки волокон; экспрессия наблюдалась в молодых волокнах на стадии развития растения (10–15 день после встраивания) под контролем E6 промотора или в старых волокнах, на 35–40 день, когда гены контролировались EbL2A промотором. Уровень активности эндогенной тиолазы лежал в диапазоне 0.01–0.03 мМ/мин./мг, редуктазной активности – между 0.07–0.52 мМ/мин./мг. Наличие гранул полимера в волокнах хлопчатника, как оказалось, привело к улучшению фотосинтетических свойств растения (Chowdhury, John, 1998). Возможно, этим открывается путь модификации свойств волокон хлопчатника, включая их способность к окрашиванию, теплопроводность, деформируемость. Максимум

содержания ПОБ в волокнах, однако, составил всего около 3.4 мг/г сухого веса волокон.

Эти результаты открывают дорогу для будущего индустриального применения растений для получения биопластиков. Фотосинтетическая продукция ПОА на естественном свете может оказаться намного выгоднее по сравнению с энергоемким микробным синтезом. Кроме этого, появляется возможность влиять на свойства растительных тканей.

Таким образом, имеющееся разнообразие микроорганизмов, аккумулирующих ПОА, продолжающееся выявление новых продуцентов, открывшиеся грандиозные перспективы в связи с возможностями генетического манипулирования, а также приращение новых знаний о процессе биосинтеза и свойствах ПОА в целом обещают расширение возможностей и перспектив для данных биопластиков, как материала XXI века.

## **2.6. Субстраты и способы биосинтеза полиоксиалканоатов**

Несмотря на большое количество известных типов ПОА, как было отмечено выше, в настоящее время только несколько из них всесторонне изучаются и производятся или планируются к производству в промышленных масштабах. Это полимеры и сополимеры 3- и 4-оксимасляной кислоты (ЗПОБ,4ПОБ,ЗПОБ-со-4ПОБ), сополимеры оксимасляной и оксивалериановой кислот (ЗПОБ-со-ЗПОВ), сополимеры оксигексановой и оксиоктановой кислот (ЗПОГ-со-ЗПОО) (Braunegg et al., 1998; Lee, 1996; Madison, Huisman, 1999) и недавно охарактеризованные сополимеры оксибутирата и оксигексаноата (Kobayashi et al., 1994).

Из более чем 300 известных представителей микроорганизмов, синтезирующих полиоксиалканоаты, в качестве реальных кандидатов для промышленного использования активно изучаются и рассматриваются небольшое число продуцентов. Это *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, несколько штаммов метилотрофов и трансгенные штаммы *E. coli*, *Al. eutrophus*, *Klebsiella aerogenes*. Данные организмы обладают свойствами, необходимыми для промышленного продуцента биопластиков. Среди таковых – способность синтезировать ПОА в плотных культурах и с высокими выходами при относительно небольших затратах времени, высокая валовая продуктивность на единицу объема биореактора, способность усваивать различные источники углерода с высокой степенью конверсии субстрата в продукт, отсутствие серьезных трудностей в ходе процедуры экстракции и очистки полимеров, необходимые физико-химические свойства

синтезируемого полимера (молекулярная масса, кристалличность, температура плавления, механическая прочность и др.).

В значительной мере стоимость ПОА определяется затратами на исходное сырье, поэтому одно из магистральных направлений исследований ориентировано в настоящее время на поиск доступных субстратов для их получения. С этой целью в настоящее время активно изучают закономерности и эффективность биосинтеза ПОА уже известными организмами с привлечением новых субстратов, продолжают поиск новых природных штаммов-продуцентов ПОА и конструируют трансгенные продуценты, способные усваивать различные, в т. ч. новые субстраты. Для получения полиоксиалканоатов в принципе возможно привлечение разнообразных субстратов. Среди известных – индивидуальные соединения (углекислый газ и водород, сахара, спирты, органические кислоты), отходы спиртовой, сахарной, гидролизной промышленности, производства оливкового и пальмового масла и др., а также необычные субстраты, включая токсичные.

Бактерии, используемые для получения ПОА, по применяемым методам культивирования подразделяют на две группы. К первой относятся организмы, эффективный синтез ПОА у которых происходит при избытке источника энергии и углерода в среде, но при лимитировании роста одним из биогенных элементов (азотом, серой, фосфором, калием, магнием или кислородом). К этой группе относятся *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* и другие.

Ко второй группе относятся микроорганизмы, характеризующиеся способностью эффективно синтезировать ПОА при высоких скоростях роста, без ограничения роста каким либо лимитирующим фактором. Это *Alcaligenes latus* и рекомбинантные организмы, содержащие биосинтетический оперон из *Al. eutrophus*.

Исходя из физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов-продуцентов ПОА, на практике для получения полимеров используют в основном два типа культивирования, – периодическое (или периодическое с подпиткой субстратом) и проточное. Однако, и при периодическом, и при проточном способах ферментации необходимо создать условия, при которых обеспечивается высокая продуктивность процесса.

У микроорганизмов, относящихся к первой группе, аккумуляция ПОА наиболее активно происходит при несбалансированном росте в медленно растущих клетках, следовательно, высокопродуктивные проточные системы ферментации для таких продуцентов не приемлемы. В этой связи возникает вопрос, как получить большие урожаи биомассы одновременно с высоким (до 70 % и выше) внутриклеточным содержанием ПОА. Поэтому микроорганизмы первой группы, как правило, выращивают в периодическом режиме, применяя либо

двухстадийный процесс, либо два последовательно работающих аппарата. На первой стадии (или в первом аппарате), в ходе которой микроорганизмы выращивают на полной питательной среде, происходит образование практически всей биомассы. Далее, на втором этапе используют среду, из состава которой исключают один из биогенных элементов, и процесс продолжают еще некоторое время (15–30 часов). За это время прироста биомассы практически не происходит, а наблюдаемое увеличение плотности культуры связано главным образом с увеличением массы полимера в клетках. Для максимального выхода полиоксибутирата и сополимеров ПОБ-со-ПОВ (до 80 % к весу сухого вещества) в таком режиме культивирования, например, у *Alcaligenes eutrophus*, используют на первом этапе полную питательную среду, а на втором – не содержащую азота. (Byron, 1987; Kim et al., 1994a,b). Однако соотношение длительности этих двух фаз и оптимальную величину биомассы, накапливаемую на первом этапе, следует строго определять исходя из конечной цели процесса, предварительно исследовав кинетику образования биомассы и выхода ПОА при заданных условиях культивирования. Так, в экспериментах с *Alcaligenes eutrophus* продемонстрировано (Kim et al., 1994a), что при двухстадийном процессе концентрация ПОБ в культуре может быть увеличена с 71 до 92 г/л, соответственно, при изменении урожая клеток от 30 до 55 г/л; а при увеличении клеточной концентрации до 70 г/л конечная концентрация полимера достигает 121 г/л. Однако при полном исчерпании азота из среды урожай клеток снижается до 90 г/л, при этом происходит также снижение внутриклеточной концентрации полимера и его валовой продукции. У других представителей данной группы более эффективная продукция полимеров происходит при культивировании бактерий в условиях действия лимитирующего фактора, а не при полном исчерпании из среды какого-либо биогенного элемента.

Для бактерий второй группы также используют периодический тип культивирования, однако при этом питательная среда содержит все необходимые элементы, концентрацию которых корректируют по мере увеличения клеток в культуре, а также вводят в состав среды дополнительные органические источники азота (кукурузный и соевый экстракты, рыбный пептон). Это обеспечивает хорошие выходы клеточной биомассы при высоком внутриклеточном накоплении ПОА, так как эти два процесса у микроорганизмов конститутивно сбалансированы (Page, Cornish, 1993; Lee, Chang 1994 a). Снижение концентрации биомассы, например, в культуре у *Alcaligenes latus*, приводит, как правило, и к снижению уровня ПОБ. Рекомбинантные штаммы, полученные на основе быстрорастущей *E. coli* с клонированными из *Al. eutrophus* генами синтеза ПОБ, обеспечивают очень

высокие выходы продукта, до 200 г/л (Lee, 1996с). Процесс хорошо иллюстрируется следующими уравнениями:

$$X = R + P, \quad (1)$$

и

$$f = P X^{-1}. \quad (2)$$

Из данных уравнений следует:

$$P = R f (1 - f)^{-1}, \quad (3)$$

и далее получим:

$$X = P f^{-1} \leq X_{\max}, \quad P \leq X_{\max} f_{\max}, \quad (4)$$

где, соответственно,  $X$ ,  $P$ ,  $R$  – концентрация клеток, ПОБ и остаточных клеток;  $f$  – функция содержания ПОБ, и  $P_{\max}$ ,  $X_{\max}$ ,  $f_{\max}$  – максимально достижимые значения концентрации ПОБ, клеток и содержания ПОБ.

Важным моментом является время прекращения процесса ферментации. В большинстве случаев ферментация может быть остановлена при максимальных значениях концентрации полимера, но это скажется на снижении общей продуктивности. Увеличение длительности ферментационного цикла обеспечивает увеличение концентрации полимера с незначительным уменьшением продуктивности вследствие возникновения некоторых проблем по выделению и очистке полимера.

Теоретически непрерывное культивирование должно обеспечить наивысшую продуктивность. Однако, только с бактериями *Al. latus* и *Ps. oleovorans* получены удовлетворительные результаты продукции ПОА в проточном режиме (Preusting et al., 1992; 1993). Состояние *steady-state* в культуре *Al. latus* на фруктозе достигнуто при уровне ПОБ в 16 г/л при продуктивности, равной 2.5 г/л ч. В культуре *Ps. oleovorans* на октане в качестве источника углерода (15 % об.), при лимите азота в среднем изменение скорости потока от 0.09 до 0.46 ч<sup>-1</sup> сопровождалось снижением концентрации биомассы и ПОБ, соответственно, с 2.25 г/л и 46.7 % до 1.32 г/л и 8.3 %. В состоянии *steady-state* концентрация ПОБ составила 11.6 г/л, продуктивность – 0.58 г/л ч.

По математическому моделированию динамики биосинтеза полиоксиданоксаноатов бактериями опубликовано немного работ (Yoon et al., 1994; Lee J.H. et al., 1997; Katoh et al., 1999). Существенный интерес представляет последняя работа (Katoh et al., 1999), в которой построена модель биосинтеза поли-β-оксибутирата (Q) из молочной кислоты (S) при лимитировании роста бактерий по азоту, где кроме лимитирования по азоту учитывалось субстратное ингибирование



роста бактерий лактатом  $\mu(S, N)$ , записанное в виде зависимости Бриггса–Холдейна.

Следует отметить, что такой вид зависимости весьма перспективен и для описания биосинтеза полиоксиалканоатов различными бактериями на разнообразных, в том числе токсичных субстратах (например, октане). В данной модели рассматривается также, что микроорганизмы накапливает поли- $\beta$ -оксибутират внутри клетки в ответ на лимитирование по азоту. Однако такая модель несовершенна, поскольку при голодании по азоту останавливается рост клеток, а не биосинтез полигидроксибутирата. Авторы попытались обойти эту трудность, прибегнув к детальному рассмотрению метаболических потоков в клетке, происходящих в биохимических путях синтеза полиоксиалканоатов с учетом различного соотношения  $C/N$ . Такой подход позволил также оценить величину целого ряда коэффициентов модели. Было обнаружено явное несоответствие расчетных данных и параметров биосинтеза, полученных в эксперименте, которое было отнесено на счет сложности динамической системы смешанной культуры.

К настоящему времени разрабатываются также и проходят экспериментальную проверку и структурированные модели процессов биосинтеза полиоксиалканоатов бактериями, из которых наиболее основательной является работа (Grobe-Uhlmann and Bley, 1999). Авторы работы развивают весьма перспективный подход к описанию биосинтеза внутриклеточного полимера, основанный на известной модели Шапи с соавторами, в которой бактериальные клетки представлены как структурированные системы, содержащие два компартмента – остаточную массу внутриклеточных макромолекул и, собственно, полимер (Snape et al., 1995). Полагается, что биомасса бактерий содержит два главных компонента: метаболически активную часть, называемую остаточной биомассой, и метаболически неактивную часть – внутриклеточный полимер (ПОБ). Во время фазы роста лимитирующий субстрат (азот) расходуется на синтез белка, при исчерпании субстрата синтез белка останавливается, а синтез полимера в клетках активизируется. В этой модели учитывается также ингибирование роста субстратом и процессы, участвующие в биосинтезе и аккумуляции полимера в клетках.

Для поиска кинетических коэффициентов процессов биосинтеза полиоксиалканоатов в культуре микроорганизмов с привязкой их к конкретным условиям управляемого культивирования авторы работы применили широко известные методы фильтров Калмана и Гаусса. В то же время, в этой и других работах отмечаются и недостатки существующих моделей процессов биосинтеза полиоксиалканоатов культурами микроорганизмов, в том числе и водородокисляющих бактерий. Отмечается, что удовлетворительных моделей роста культур

микроорганизмов и аккумуляции полиоксиалканоатов в клетках с построением теории метаболического контроля перехода клеток из фазы роста в фазу синтеза и аккумуляции полимера на целом ряде перспективных для промышленного применения субстратов пока не предложено.

Экспериментально исследуются двухстадийные хемостатные режимы, однако имеющиеся результаты пока не очень обнадеживают. Недавно исследован процесс накопления ПОБ в двухстадийной проточной культуре *Al. eutrophus* (Lee, 1996a, b). Оптимизация режима обеспечила получение во втором аппарате следующих показателей процесса по концентрации биомассы клеток и полимера, соответственно, до 75 и 44.8 г/л (при скорости разбавления 0.064 ч.<sup>-1</sup>). Продуктивность получения полимера составила 2.86 г/л/ч. Продуктивность в двухстадийном хемостате в целом была в 1.7 раза выше по сравнению с одностадийным режимом. Некоторые перспективы, вытекающие из проточных режимов, ограничивают пока широкое их использование из-за сопутствующих технологических проблем, а именно, нестабильности процесса и контаминации. Однако некоторые культуры микроорганизмов, в том числе рекомбинантные, у которых быстрый рост ассоциирован с суперпродукцией ПОА, являются перспективными кандидатами для проточного выращивания. Для этого требуются дальнейшие исследования, направленные на оптимизацию процесса культивирования бактерий как по выходу полимера, так и по общей продуктивности процесса и технико-эко-но-мический анализ возможных вариантов.

Тип используемого для получения полиоксиалканоатов сырья определяется исходя из физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов и экономической целесообразности выбранной стратегии, а также области применения готовой продукции. В связи с тем, что ПОА перспективны для применения в медицине, фармакологии, пищевой промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, масштабы производств полимеров могут быть самыми разными, от малотоннажных в десятки килограммов (для медицины и фармакологии), до десятков тонн в год и более. Таким образом, требования, выдвигаемые к качеству и стоимости сырья, для различных объемов производств и областей применения, также различны. Сырьем для получения ПОА могут быть самые разные субстраты, обладающие различной степенью восстановленности, энергосодержанием и, конечно, стоимостью (таблица 2.5). В этом списке – индивидуальные соединения (сахара различной природы, спирты, кислоты, углекислота, углеводороды), а также комплексные субстраты, включающие отходы различных промышленных и сельскохозяйственных производств.

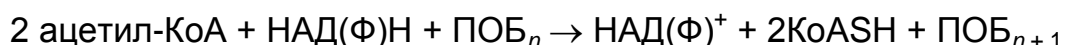
Таблица 2.5

**Затраты и стоимость сырья для синтеза полиоксибутирата  
(Collins, 1987; Lee, 1996)**

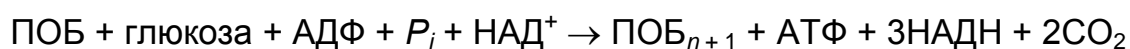
| Субстрат                  | Стоимость субстрата, \$ США /т | Выход полимера, т/т субстрата | Стоимость субстрата \$ США /т полимера |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|
| Глюкоза                   | 220–493                        | 0.38                          | 580–1300                               |
| Сахароза                  | 290                            | 0.40                          | 720                                    |
| Метанол                   | 110                            | 0.18                          | 610                                    |
| Этанол                    | 440                            | 0.50                          | 880                                    |
| Уксусная кислота          | 370–595                        | 0.33–0.38                     | 1220–1560                              |
| Декстроза                 | 360                            | 0.33                          | 1180                                   |
| Водород                   | 500                            | 1.0                           | 500                                    |
| Тростниковый сахар        | 200                            | 0.33                          | 660                                    |
| Меласса                   | 220                            | 0.42                          | 520                                    |
| Молочная сыворотка        | 71                             | 0.33                          | 220                                    |
| Гемицеллюлозные экстракты | 69                             | 0.20                          | 340                                    |

В связи с тем, что значительная доля стоимости ПОА приходится на долю исходного сырья, магистральное направление исследований, определяющее стратегию промышленного производства полиоксиалканоатов, в настоящее время связано с возможностями расширения сырьевой базы. Поэтому в последнее время активизированы работы, ориентированные на поиск новых субстратов и расширение сырьевой базы. При этом исследуется рост и синтез ПОА как уже известными и изученными микробными штаммами с привлечением новых субстратов, а также продолжается поиск новых природных и конструирование новых штаммов, способных эффективно усваивать новые субстраты.

Биосинтетический путь образования полиоксибутирата в бактериях в общем виде можно представить следующей реакцией:



Сахара рассматриваются в качестве субстрата для синтеза полиоксиалканоатов различными микроорганизмами, в том числе водородными бактериями *Alcaligenes eutrophus* и *A. latus*. Природные штаммы данных микроорганизмов из спектра сахаров используют, как известно, только фруктозу. Однако легко получаемые мутантные штаммы утилизируют также глюкозу и сахарозу, включая их по пути Дудорова–Этнера. Синтез полиоксибутирата по данному пути выглядит следующим образом (Collins, 1987):

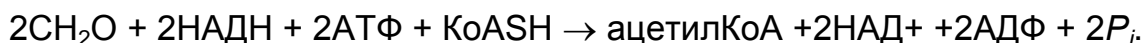


Теоретически возможны затраты сахаров на образование полимера около 2.5 г/г; однако реальные затраты, например, в производстве IC1 составляют до 3.0–3.3 г/г ПОБ.

Мутантные штаммы *E. coli* с интродуцированной генетической системой синтеза ПОА из *A. eutrophus* также культивируют на средах с глюкозой в качестве источника углеродного питания. В данном случае в состав сред входят различные органические добавки и стимуляторы, без которых культивирование трансгенных штаммов не представляется возможным. В принципе на сахарах реализованы процессы различной степени интенсивности и масштаба (таблица 2.6).

Субстратом для синтеза полиоксибутирата у метилотрофов служит метанол, обеспечивающий высокие общие урожаи биомассы (таблица 2.7).

Описан синтез ПОБ у факультативных метилотрофов с сериновым путем с участием пируват дегидрогеназы для образования ацетил-КоА. Последний может также образовываться через фосфоглицерат, но альтернативный путь менее энергетически эффективен:



Суммарная реакция синтеза полиоксибутирата на метаноле выглядит следующим образом:

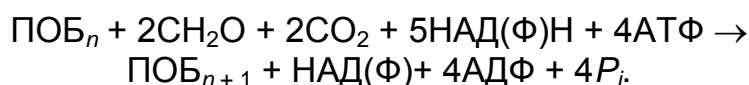


Таблица 2.6

Показатели микробиологических процессов получения ПОА (Bourque et al., 1995; Ryu et al., 1997)

| Микроорганизм                | Лимитирующий элемент | Объем реактора, л | Урожай, г/л | Содержание ПОБ, % | Выход, г ПОБ/г |
|------------------------------|----------------------|-------------------|-------------|-------------------|----------------|
| <i>A. eutrophus</i>          | N (55 г/л)           | 2.5               | 124         | 74                | 0.30           |
|                              | N (70 г/л)           | 2.5               | 164         | 76                | 0.31           |
|                              | P (2.2 г/л)          | 60                | 125         | 81                | 0.31           |
|                              | P (4.3 г/л)          | 60                | 221         | 81                | 0.37           |
| <i>Methylotrophus</i>        | N                    | –                 | 233         | 64                | 0.20           |
|                              | K                    | –                 | 250         | 52                | 0.18           |
| Рекомбинантный <i>E.coli</i> | –                    | 2.5               | 117         | 76                | 0.33           |

Таблица 2.7

Показатели продуктивности процесса биосинтеза и выхода ПОА на метаноле (Bourge et al., 1992; Lee, 1996)

| Микроорганизм                      | Объем реактора, л | Урожай, г/л | Содержание ПОБ, % | Выход, г ПОБ/г |
|------------------------------------|-------------------|-------------|-------------------|----------------|
| <i>Methylobacterium extorquens</i> | 3.5               | 114         | 40                | 0.18           |
|                                    | 14                | 114         | 46                | 0.22           |
|                                    | 60                | 221         | 81                | 0.37           |
| <i>M. organophilum</i>             | 16                | 250         | 52                | 0.20           |

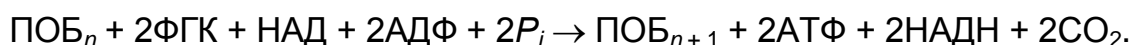
Однако низкая энергетическая эффективность реакции сопровождается большими затратами метанола на образование биомассы и полимера (таблица 2.6). Экономический коэффициент синтеза ПОБ на метаноле составляет 0.18–0.20 г ПОБ/г.

Водород рассматривается как альтернативный субстрат по отношению к сахарам и метанолу, но трудности ферментации на газовом субстрате из-за его взрывоопасности и плохой растворимости, накладывают определенные ограничения на этот субстрат при его рассмотрении применительно к крупнотоннажным процессам.

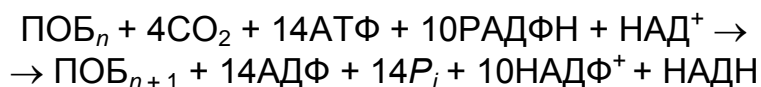
При росте водородных бактерий рода *Alcaligenes* на водороде фиксация углекислоты (источника углерода) реализуется в цикле Кальвина со следующими затратами АТФ и восстановительных коэффициентов:



если фосфоглицериновая кислота (ФГК) конвертирует в ПОБ через фосфоэнолпируват, реакция синтеза пирувата и ацетил-КоА выглядит, как:



Суммарная реакция может быть представлена, как:



Эффективность биосинтеза ПОБ на водороде в качестве энергетического субстрата высокая; затраты субстрата на образования продукта – минимальны. Экономический коэффициент получения полиоксисалканоатов на водороде составляет 1. Поэтому освоение этого субстрата может стать перспективным при развитии уровня техники ферментации. К настоящему времени достигнуты достаточно высокие показатели процесса (Tanaka et al., 1995); получен урожай в периодической культуре *Alcaligenes eutrophus* свыше 90 г/л при внутриклеточной концентрации ПОБ 67.8 %. Оптимизация режима газообеспечения культуры и создание установок с высокими массообменными характеристиками позволили повысить выход полимера в автотрофной культуре водородных бактерий до 80–90 г/л (Ishizaki et al., 2001).

Таким образом, в качестве возможных субстратов для крупнотоннажного производства ПОА исследуются а) известные субстраты – смеси водорода и углекислоты, глюкоза, фруктоза, маниока, меласса, лактоза, молочная сыворотка, метанол, тапиока, (Tanaka et al., 1995; Kim et al., 1994b; Ryu et al., 1997; Yamane et al., 1996; Wong and Lee, 1998; Sugimoto et al., 1999) б) новые субстраты: углеводородные кислоты (пентановая, олеиновая, октановая, нонановая,) и октан (Haazenbergh, Witholt, 1997), глюконат (Rodrigues et al., 1995),

белковые гидролизаты (пептона, казеина) (Borman et al., 1998;), ксилоза (Lee, 1998), гидролизаты гемицеллюлоз (Ramsay et al., 1994), смеси жирных кислот животного и растительного происхождения (Cromwick et al., 1996), отходы производства оливкового и пальмового масла (Tan et al., 1997), а также в) необычные субстраты: метакриловая кислота (Lee et al., 1997), триглицериды (Ashby, Foglia, 1998; Solaiman et al., 1999) и жидкие продукты переработки углей (Füchtenbusch, Steinbüchel, 1999).

В связи с известной способностью бактерий *Pseudomonas* и мутантов на их основе синтезировать средне- и длинноцепочечные ПОА, достаточно активно исследуется возможность реализации процесса получения полимеров на жирах и жирных кислотах, в том числе за счет привлечения отходов переработки с/х масличных культур. Так, на олеиновой кислоте возможно получение шестикомпонентных ПОА при общем содержании полимера от 15 до 45 % в проточной культуре *P. putida* KT2442 в диапазоне  $D$  0.05–0.27 ч<sup>-1</sup> (Huijberts, Eggink, 1996). Штамм *P. putida* PGA1 при культивировании на жирных кислотах, содержащихся в отходах производства пальмового масла, синтезирует шести- и семикомпонентные ПОА с молекулярной массой от 124 000 до 174 000 Da при общем урожае культуры 3.0–8.8 г/л и выходах ПОА от 19 до 37 % (Tan et al., 1997). Трансгенные штаммы *Alcaligenes* H16 на жиросодержащих средах, получаемых из оливкового, пальмового и кукурузного масел синтезируют до 76–82 % ПОА (Fukui, Doi, 1998). *Pseudomonas oleovorans* и мутантные штаммы данного организма с *phb*-генами из *Alcaligenes*, а также рекомбинантные штаммы *E. coli* содержащие гены синтеза ПОА из *Ps. oleovorans*, при росте на смесях различных жирных, включая насыщенные и ненасыщенные ЖК, 3-гидроксиалкановые кислоты, а также алканы с длиной углеродной цепи от C<sub>8</sub> до C<sub>18</sub> способны синтезировать многокомпонентные ПОА, содержащие, помимо оксибутирата, оксигексаноат, оксиоктаноат, оксидодеканоат, от следовых включений до 14–80 мол. % для отдельных мономеров. Общий выход ПОА при этом достигает свыше 60 % (Füchtenbusch et al., 2000).

Для получения разнообразных по составу ПОА в качестве возможных источников углерода исследованы самые различные, часто нетрадиционные, субстраты. Среди них – 1,3-бутандиол, обеспечивающий синтез широкого спектра длинноцепочечных ПОА бактериями *Pseudomonas* sp A33; субстраты, содержащие триглицериды, на которых бактерии *Pseudomonas resinovorans* и *Pseudomonas saccharophila* способны синтезировать различные по составу длинноцепочечные ПОА с достаточно высокими выходами, до 44–50 % (к весу сухой биомассы). При этом уровень таких включений, как оксиоктаноат, оксидеканоат, оксидодеканоат достигают 30–40 мол. % (Achby and Foglia, 1998; Solaiman et al., 1999). Проведено исследова-

ние октана для продукции полиоксиалканоатов различными культурами *Pseudomonas* (*Ps. oleovorans*, *Ps. thruringiensis*, *Ps. putida*) в периодической культуре, а также в проточных режимах (Hazenbergh, Witholt, 1997). Авторами установлено, что возможны достаточно продуктивные процессы синтеза ПОА в периодической и в проточной культурах *Pseudomonas oleovorans*, до получения урожая биомассы в 40–93 и 11–18 г/л соответственно. Установлена также возможность синтеза ПОА, содержащих в качестве мономеров включения с различной длиной углеродной цепи, от C<sub>4</sub> до C<sub>14</sub> культурами *Pseudomonas* (*Ps. putida*, *Ps. oleovorans*, *Ps. citronellois*, *Ps. resinovorans*) с использованием жирных кислот и триглицеридов активного ила (Cromwick et al., 1996). Показана применимость для синтеза среднецепочечных ПОА бактериями *Pseudomonas putida* продуктов омыления масел и жирных кислот из отходов, образуемых при переработке пальмового масла (Tan et al., 1997). Образуемые полимеры в зависимости от жирнокислотного состава субстрата содержат в качестве сополимеров оксикислоты C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>12</sub> и C<sub>14</sub>. Сравнительно недавно успешно реализован в промышленном масштабе процесс биосинтеза сополимеров оксибутирата и оксигексаноата бактериями при росте на глюкозе и в качестве индуктора для синтеза среднецепочечных ПОА лауриновой кислоте (Chen et al., 2001).

Выявлено, что мутантные штаммы дрожжей *Candida rugosa* способны синтезировать D-β-оксиизомаляновую кислоту при использовании изомаляновой кислоты как источника углерода (Kim et al., 1999); концентрация биомассы в культуре составляет до 30 г/л. Полученные в результате селекции бактерии *Azotobacter beijerinckii* при росте на органических источниках углерода (казеиновый пептон, дрожжевые экстракты и гидролизаты) в сочетании с сахарами (глюкозой или сахарозой) синтезируют полиоксибутират с различной интенсивностью, от единиц до 55 % ПОА к сухому весу клеточной биомассы (Vormann et al., 1998). *Alcaligenes eutrophus* DSM 11348 на средах с глюкозой, а также комплексными органическими источниками азота (гидролизаты казеина и смеси аминокислот) в течение короткого ферментационного периода (около 40 часов) синтезируют с различными выходами, включая высокие (свыше 80 %), полиоксибутират. Процесс масштабирован в 300-л литровом аппарате (Vormann et al., 1998).

Рассматриваются также возможности получения полиоксиалканоатов с использованием отходов. Практически неисчерпаемым источником сырья для крупнотоннажного получения полиоксиалканоатов могут стать растительные биомассы, образуемые в огромных количествах ежегодно. Отходы различных сельскохозяйственных культур, содержащие полисахариды различной структуры и состава, могут быть гидролизованы с получением спектра водорастворимых сахаров. Например, показано, что рекомбинантные штаммы *E. coli*,

трансформированные генами *Al. eutrophus*, способны синтезировать полиоксибутират на средах, содержащих ксилозу (20 г/л) с добавками органических форм азота, получаемых из растительных отходов. Среди них – кукурузные и соевые гидролизаты, гидролизаты вегетативной биомассы хлопчатника и др. (Lee, 1998). Гидролизаты целлюлозы, содержащие ксилозу, обеспечивают урожаи и выходы ПОА у бактерий *Ps. seracia*, сопоставимые с процессом на фруктозе (Ramsay et al., 1995); продукционная цена полиоксибутирата при этом аналогична процессу на мелассе и в два раза ниже, по сравнению с глюкозой.

В настоящее время все чаще появляются работы, рассматривающие в качестве сырья для ряда биотехнологических производств угли и продукты их переработки (Catcheside, Ralph, 1999; Fakoussa, Hofirichter, 1999). В связи с огромными запасами и относительно низкой стоимостью данный субстрат представляет интерес и для будущих крупнотоннажных производств микробных биопластиков. Такие исследования начаты. Недавно опубликована работа по изучению продукции среднецепочечных полиоксиалканоатов несколькими культурами *Pseudomonas* на средах, содержащих в качестве источника углерода продукты переработки углей – смеси гуминовых кислот (Füchtenbusch, Steinbüchel, 1999). Установлено, что бактерии *Ps. oleovorans* способны аккумулировать ПОА, содержащие 3-оксигексаноат, 3-оксидеканоат и 3-оксидодеканоат, а бактерии *Rhodobacter ruber* – смеси 3-оксибутирата и 3-оксивалерата. Показано, что продукты гидролиза углей, полученные биологическим путем на основе культуры *Trichoderma*, является для *Ps. oleovorans* по сравнению с продуктами химического гидролиза углей, более выгодным субстратом. В перспективе возможна организация двух-, трех-этапных биотехнологических процессов, в ходе которых на первых стадиях угли будут трансформироваться до водорастворимых продуктов, например, грибными культурами, а далее, эти субстраты можно будет использовать для синтеза ПОА.

Выполненные сравнительно недавно технико-экономические оценки свидетельствуют о том, что в принципе возможно создание экономически приемлемых крупнотоннажных производств ПОА на различном сырье, включая отходы сельскохозяйственных и промышленных производств (Choi, Lee, 1997; 1999; Hazenberg, Witholt, 1997; Braunegg et al., 1998; Natano et al., 2001).



## Глава 3. СВОЙСТВА ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ

### 3.1. Молекулярная структура и физико-химические свойства ПОА

Полиоксиалканоаты, синтезируемые природными и генетически модифицированными организмами, имеют различные химические строения, определяемое соотношением входящих в их состав мономерных единиц, характеризуются различными физико-механическими свойствами и могут быть использованы для получения различными методами пленок, волокон, нетканых материалов и др. (Amass et al., 1998; Sudesh et al., 2000 и др.). Среди идентифицированных к настоящему времени свыше 100 ПОА (Steinbüchel and Valentin, 1995).

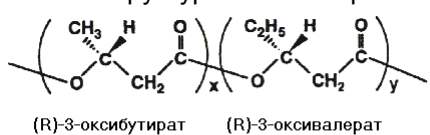
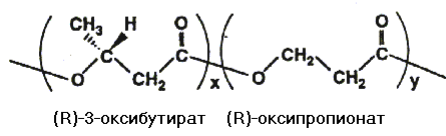
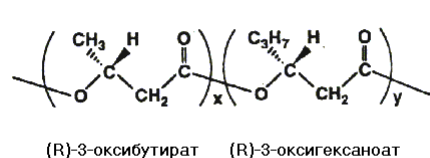
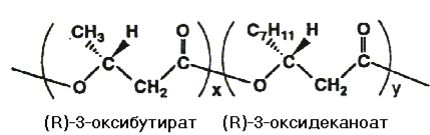
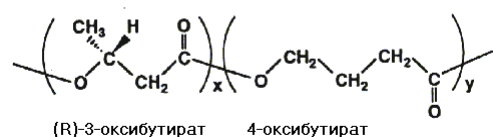
| Продуцент  | Субстрат  | Структура сополимеров  |
|--|---|--|
| <i>Ralstonia eutropha</i>                                | пропионовая кислота                               | <br>(R)-3-оксибутират    (R)-3-оксивалерат   |
| <i>Ralstonia eutropha</i>                                | пентановая кислота<br>3-оксимасляная кислота      | <br>(R)-3-оксибутират    (R)-оксипропионат   |
| <i>Alcaligenes latus</i><br><i>Aeromonas caviae</i>      | 1,5-пентандиол<br>растительные жиры               | <br>(R)-3-оксибутират    (R)-3-оксигексаноат |
| <i>Pseudomonas sp.</i><br><i>Ralstonia eutropha</i>      | сахара<br>4-оксимасляная кислота                  | <br>(R)-3-оксибутират    (R)-3-оксидеканоат  |
| <i>Alcaligenes latus</i><br><i>Comamonas acidovorans</i> | γ-бутиролактон<br>1,4-бутандиол<br>1,6-гександиол | <br>(R)-3-оксибутират    4-оксибутират       |

Рис. 3.1. Структуры ПОА, содержащих в качестве базового мономера 3-оксибутират и другие мономеры (Sudesh et al., 2000)

**Таблица 3.1**

**Свойства полиоксисалканоатов различного состава (Madison and Huisman, 1999)**

| Параметр                   | Тип полимера |               |               |               |              |
|----------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
|                            | 3(ПОБ)       | 3(ПОБ-со-ПОВ) | 3ПОБ-со-4-ПОБ | 3(ПОО-со-ПОГ) | Полипропилен |
| $T_{пл}$ (°C)              | 177          | 145           | 150           | 61            | 176          |
| $T_{ст}$ (°C)              | 2            | -1            | -7            | -36           | -10          |
| Кристалличность (%)        | 70           | 56            | 45            | 30            | 60           |
| Растяжение при разрыве (%) | 5            | 50            | 444           | 300           | 400          |

Свойства ПОА определяются их строением, прежде всего, они зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле (рис. 3.1).

Уже сейчас на примере только нескольких типов ПОА показано, что свойства ПОА меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи (таблица 3.1). В результате этого на базе ПОА можно иметь спектр материалов с различными физико-механическими свойствами, пригодными для различных применений.

### 3.1.1. Поли-3-оксибутират (3-ПОБ)

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему моменту охарактеризованным полиоксисалканоатом является полиоксибутират (ПОБ). Полиоксибутират ( $C_4H_6O_2$ ) является гомополимером D(-)-3-β-оксимасляной кислоты и представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами ( $C_4H_6O_2$ ). В отличие от сложных синтетических полиэфиров, полиоксибутират – это стереорегулярный оптически активный полимер, который образует спирали в растворе и кристаллизуется в сферолиты.

Внутри клеток ПОБ, как и другие ПОА, аккумулируется в цитоплазме в виде сферических включений (гранул) (рис. 3.2) и находится в гранулах в подвижном аморфном состоянии. Количество гранул в клетке может составлять от 2–4 до 12. На 98 % гранулы состоят из полимера. В составе гранул присутствуют также фосфолипиды и белки в количестве, соответственно, 2.1 мг и 0.2 μм на 100 г полимера (Dawes and Senior, 1974; Ellar et al., 1973). Гранулы заключены в мембрану толщиной 2–4 мкм.

Гранулы образованы фибриллярными структурами, которые представляют собой двойные нити в виде закрученных вправо лент. Последние образуют мицеллообразные кристаллы полимера (Alper and Lundgren, 1963). Плотность и высокая гидрофобность полимерных цепей в гранулах связана с наличием ограничивающих фосфо-

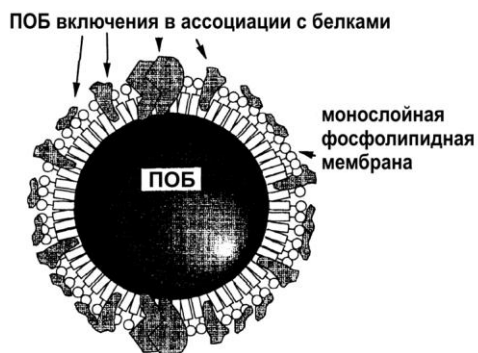


Рис. 3.2. Модель структуры гранул ПОБ *in vivo* в ассоциации со специфическими белками-фазинами. Соотношение сердцевины и мембраны на рисунке даны не в реальном масштабе (Sudesh et al., 2000).

липидных оболочек, которые расположены монолинейно и укреплены белковыми структурами (Senior, 1984).

В живых клетках ПОБ в гранулах находится в мобильном состоянии, но не в растворенном. Установлено, что вода ассоциирована в части гранул и в какой-то мере выполняет роль пластификатора (Bontrone et al., 1992), хотя роль воды как пластификатора полимера, не выяснена четко. Выявлено, что ферменты, катализирующие реакции синтеза ПОА, активны только в мобильном гидратированном материале и что в твердых гранулах, характерных для высушенных клеток, они в процессе сушки инактивируются. Белки, ассоциированные в мембране, представлены как ферментами, так и не катализирующими белками, которые названы фазинами (Steinbüchel et al., 1995). На примере *Bacillus megaterium* более 30 лет назад установлено, что гранулы ПОБ состоят на 97.7 % из полимера, а также белка и липидов; на долю которых приходится 1.87 и 0.46 % соответственно (Lundgren et al., 1964; Griebel et al., 1968). Внутренняя часть гранулы образована гидрофобным аморфным ПОБ, монослойной фосфолипидной мембраной, содержащей ферменты (рис. 3.2).

### 3.1.2. Кристаллизация 3-ПОБ

Только после экстракции полимера из клеточной массы неполярными растворителями начинается процесс кристаллизации полиоксибутирата (Anderson, Dawes, 1990; Doi, 1995). Кристаллизация полимера находится под кинетическим контролем и ингибируется субмикронными частицами, в которых ассоциированы белки и фосфолипиды (Bontrone et al., 1992).

Полиоксибутират представляет собой бесцветное полукристаллическое гидрофобное вещество. Плотность аморфной фазы ПОБ составляет  $1.177 \text{ г/см}^3$ , кристаллической –  $1.23\text{--}1.26 \text{ г/см}^3$  (Brandl et al., 1988; Waddington, 1994). В ПОБ кристаллическая фаза доминирует над аморфной. Изотактический полиоксибутират по строению сходен с изотактическим полипропиленом; у обоих пендантные метиловые группы прикреплены и ориентированы в полимерной цепи в единственной конформации (Brandl et al., 1988). Полиоксибутират

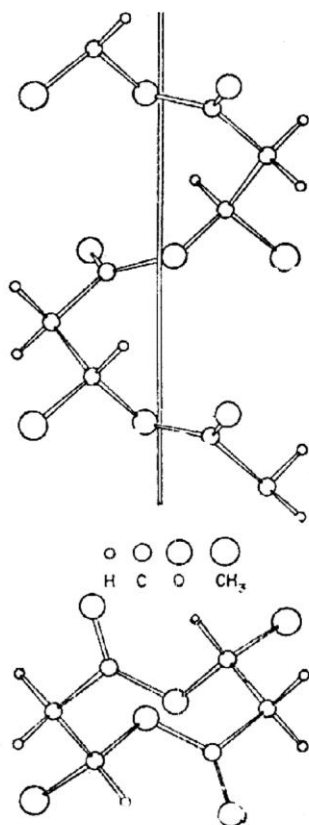


Рис. 3.3. Модель молекулы полиоксибутирата, построенная на базе рентгеноструктурного и конформационного анализа (Cornibert and Marchessault, 1972).

представлен плотно упакованными двойными спиралью, повторяющимися на расстоянии 5.95 Å и двукратно закрученными вправо вокруг оси. Конформация спирали стабилизируется взаимодействием карбонил-метильных групп и не зависит от гидроксильных групп. Цепь оксибутирата имеет  $2_1$  спиральную конформацию, орторомбические ячейки в решетке при пространстве группы  $P2_12_12_1$  характеризуются следующими параметрами:  $a=5.76$  Å,  $b=13.20$  Å,  $c=5.96$  Å (Yokouchi et al., 1974).

Кристаллическая структура ПОБ исследована рентгеноструктурным анализом ориентированных полимерных волокон. Рентгенограммы волокон показали повторение вдоль оси цепи на расстоянии 0.596 мкм плотно упакованных двойных антипараллельных цепей, упакованных в орторомбические ячейки решетки (Okamura and Marchessault, 1967; Yokouchi et al., 1973; Brückner et al., 1988) (рис.3.3).

Изолированные монокристаллы ПОБ имеют сетчатую структуру со следующими параметрами осей: короткая 0.3–2.0, длинная 5.10 мкм. Толщина одного кристалла составляет 4–10 нм в зависимости от молекулярного веса полимера, типа растворителя и температуры кристаллизации. Одиночные кристаллы ПОБ представляют собой монокристаллические системы, в отличие от них массивы ПОБ (пленки, диски и др.) являются мультикристаллическими системами, которые агрегируются в мультиориентированные кристаллические системы. ПОБ в кристалле формируют сферолиты при кристаллизации.

ции из расплавов в твердофазное состояние (Varham et al., 1984). В сферолитах ламелярные кристаллы ПОБ растут радиально, располагаясь один над другим. Кристаллографически ось  $a$  располагается радиально  $b$  и  $c$  осям, которые вращаются вокруг нее. В результате скручивания ПОБ-ламелярных кристаллов сферолиты полиоксибутирата обычно формируют ленточную текстуру. Периодичность и регулярность ленточной текстуры ПОБ зависит от температуры кристаллизации, а также молекулярного веса полимера. Максимальный объем кристаллизации полимера происходит при  $90^{\circ}\text{C}$ , а скорость кристаллизации ПОБ максимальна при  $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ .

С использованием рентгеноструктурного анализа выявлено доминирование в полиоксибутирате кристаллической фазы над аморфной. Степень кристалличности различных образцов ПОБ мало зависит от условий получения и лежит в диапазоне  $0.62\text{--}0.76$  (Lee, 1996; Madison and Huisman, 1999).

Структура полиоксиалканоатов, синтезированных бактериями *Ralstonia eutropha* B-5786 и очищенных до гомогенного состояния, исследована рентгеноскопией и методами ЯМР и ЭПР высокого разрешения (Волова с соавт., 1992, 1994; Фалалеев с соавт., 1994; Петраковская с соавт., 1995; Волова с соавт., 2000).

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов полимеров выполнены в Институте физики им. Л. В. Киренского СО РАН Васильевым А. Д. на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE (Bruker) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Для определения степени кристалличности материала сняты спектры в пошаговом режиме (scan-step) с шагом  $0.04^{\circ}$  и 2-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора  $40\text{ кВ} \times 40\text{ мА}$ ) На рис. 3.4 приведен типич-

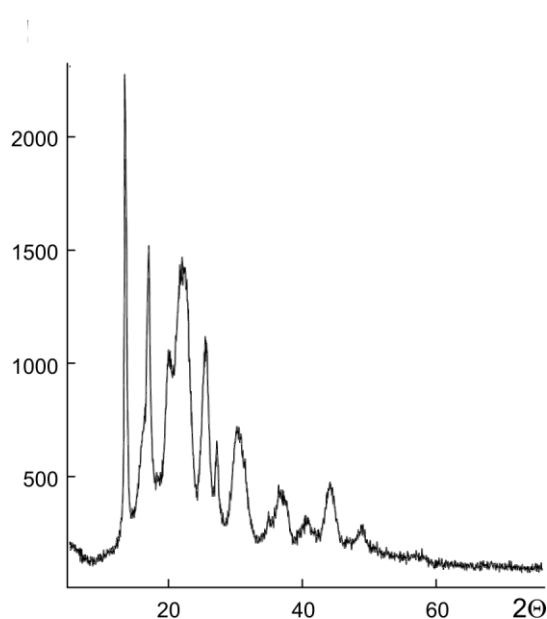


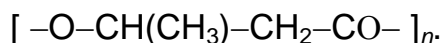
Рис. 3.4. Рентгеновский спектр полиоксибутирата, синтезированного *Ralstonia eutropha* B 5786; степень кристалличности ( $C_x$ ) 72 % (Volova et al., 2002).

ный спектр ПОБ. Рентгеноструктурный анализ различных образцов ПОБ свидетельствует о достаточно постоянных для данного материала значениях степени кристалличности ( $X_c$ ). Разброс величин, полученных на серии из нескольких десятков образцов, лежит в диапазоне 0.66–78 %.

Молекулярная структура ПОБ исследована под руководством профессора Э. П. Зеера методом ЯМР высокого разрешения (Фалалеев с соавт. 1994; Петраковская с соавт., 1995). Полученные спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  (125 МГц) и  $^1\text{H}$  (500 МГц) образцов ПОБ, синтезированных бактериями *R. eutropha* B5786 при использовании ими в качестве источника энергии водорода и углерода углекислоты совпали с высокой точностью с аналогичными спектрами, снятыми на образцах ПОБ, синтезированных *R. eutropha* H16 при росте на фруктозе и *Bacillus megaterium* KM – на глюкозе (Doi et al., 1986a, b).

### 3.1.3. Молекулярная структура и радиационная устойчивость ПОА

Полиоксибутират представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, одинаково ориентированными (head-to-tail) последовательными единицами D-(-)-3-β-оксимасляной кислоты:



$^1\text{H}$  (500 МГц) спектр раствора ПОБ в дейтерохлороформе при комнатной температуре (рис. 3.5б) иллюстрирует форму мультиплетов для CH-,  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -групп протонного спектра. Полученная форма линии для CH-группировки строго согласуется с теорией, согласно которой все приведенные на рис. 3.5б мультиплеты должны быть симметричными. Анализ констант-дипольного взаимодействия между протонами  $\text{H}_A$ ,  $\text{H}_B$  и  $\text{H}_X$  в магнитно-изолированном фрагменте, показанном на рисунке, позволил получить данные, усредненные по трем возможным конформациям, обозначенным через I, II и III (рис.3.5а), обусловленным поворотами вокруг связей  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_X-\text{CH}_A-\text{H}_B$ . С учетом общепринятых теоретических значений для констант, характеризую-

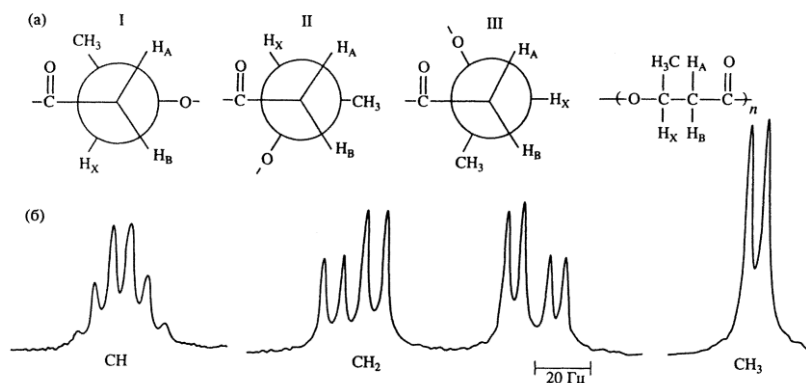


Рис. 3.5. Три возможные изомерные конформации (I – транс; II – гош; III – противоположная гош) (а) и прецизионная регистрация отдельных линий спектра  $^1\text{H}$  (500 МГц) полиоксибутирата (б), синтезированного *Ralstonia eutropha* B 5786 (Фалалеев с соавт., 1994).

щих *транс*- и *гаиш*-конформации, (Bowey et al., 1972) получено свидетельство о доминировании в полиоксибутирате конформации I и II типа и практическом отсутствии конформации III типа.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что тонкие структурные особенности молекул ПОБ, синтезированной бактериями *R. eutropha* B5786 при автотрофном росте, совпадают с молекулярными характеристиками полиоксибутирата, выделенного из других микроорганизмов, растущих в гетеротрофных условиях. Это позволяет сделать вывод о независимости тонкой структуры ПОБ от систематического положения и условий углеродного питания штаммов-продуцентов полимера.

Выявленная относительная устойчивость ПОБ к  $\gamma$ -облучению (King, 1982) побудила провести исследования структурных дефектов, образующихся в полимере после  $\gamma$ -облучения. Для этого изучены структурные особенности ПОБ и динамика его молекулярных фрагментов (Петраковская с соавт., 1995). Образцы полиоксибутирата, облученные  $\gamma$ -источником  $^{60}\text{Co}$  дозой в 5 Мрад при температуре 77 К, анализировали методами ЭПР (Hyde, 1965). ЭПР спектры сняты на спектрометре SE/X-2544 X-диапазона.

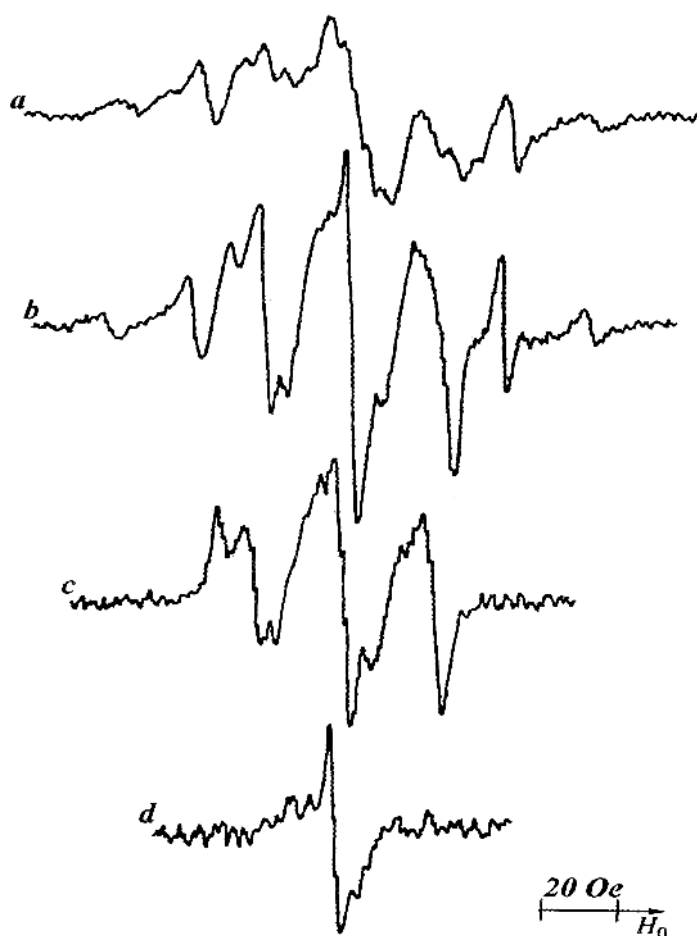


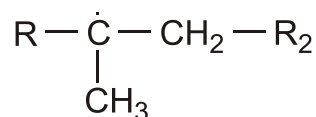
Рис. 3.6. Спектры ЭПР  $\gamma$ -облученного полиоксибутирата: а – при 77 К; б – исходный при 293 К; в – через 1.5 ч; г – через 19 ч (25 накоплений) (Петраковская с соавт, 1995).

Спектры ПОБ, облученного  $\gamma$ -источником  $^{60}\text{Co}$  дозой в 5 Мрад при температуре 77 К, представлены на рис. 3.6. В процессе размораживания образцов (около 10 мин.) принципиальных изменений в спектре в количестве и относительной интенсивности линий, за исключением его центральной части, не отмечено. В дальнейшем за счет рекомбинации образовавшихся радикалов происходило видоизменение спектра: постепенно ослабляясь, исчезали две крайние компоненты и спустя 1.5 часа спектр превращался в триплет, каждая линия которого имела дополнительное расщепление. Через 19 ч. оставались только следы данного спектра, в центре которого появлялась одиночная ассиметричная линия (рис. 3.6г). Анализ изменений компонент в дальнейшем показал, что в процессе облучения в ПОБ образуются три радикала, различающиеся временем жизни. С учетом их распада произведено последовательное вычитание их спектров из исходного (рис. 3.6б), и получены три спектра ЭПР, которые отнесены к радикалам. На начальном этапе отжига радикалов в спектре присутствовала широкая линия, соответствующая радикалу  $\text{COOH}$  (Ranby et al., 1977).

Наиболее долгоживущий радикал представлен спектром в виде ассиметричного синглета с аксиальным фактором,  $g_{\parallel} = 2.039$ ,  $g_{\perp} = 2.006$  и  $\Delta H = 8$  Э. Полученные параметры позволяют отнести спектр к известному перекисному радикалу (Пшежицкий с соавт., 1972; Ranby et al., 1977). Оставшийся после вычитания спектра триплет характеризуется константой сверхтонкого взаимодействия (СТВ)  $A_1 = 20$  Э и соотношением интенсивностей 1:2:1. Дополнительное расщепление триплетных линий свидетельствует о наличии более слабого СТВ ( $A_2 = 4$  Э). Третий спектр, полученный после вычитания, содержал набор линий, которые можно описать с приемлемой точностью тремя константами СТВ:  $A_1 = 20.5$  Э,  $A_2 = 15.4$  Э и  $A_3 = 39.6$  Э; первая из них относится к квартету линий с интенсивностями 1:3:3:1, две другие – к дублетам 1:1.

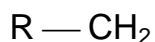
На рис. 3.7 приведены результаты сравнения полученного после вычитания экспериментального спектра с результатами машинного моделирования с помощью набора линий гауссовой формы шириной 6.5 и 4.0. Э и интенсивностями 0.5 и 3.0 соответственно. Полученные константы СТВ позволяют утверждать, что радикалы, образующиеся в облученном ПОБ, относятся к  $\pi$ -типу, и неспаренный электрон находится на  $p_2$  орбиталь атома углерода. Спектр, представленный на данном рисунке, состоит из узких линий со средней шириной  $\Delta H = 5$  Э. Это позволяет сделать вывод об участии в его формировании  $\beta$ -протонов. Наиболее вероятное место возникновения в ПОБ такого радикала – фрагмент полимерной цепи:





Данный радикал является следствием отрыва протона СН-группы. Три протона группы  $\text{CH}_3$  в модели эквивалентны. Это подтверждено полученными спектрами ЭПР при 77 и 293 К. При размораживании протонной подвижности часть спектра, относящаяся к этому радикалу, сохранялась по числу компонент и ширине линий. Два других протона (группы  $\text{CH}_2$ ) имели различные константы СТВ ( $A_2$  и  $A_3$ ). Константы СТВ для  $\beta$ -протонов, как известно, зависят от их положения, характеризующееся выражением:  $A_\beta = B_1 + B_2 \cos^2\theta$ , где  $\theta$  – угол между проекциями оси  $z$   $p_z$ -орбитали неспаренного электрона и  $\text{C}_\beta\text{—H}$  связи на плоскость, перпендикулярную линии, соединяющей  $\alpha$ - и  $\beta$ -атомы углерода, а константы  $B_1$  и  $B_2$  зависят от величины  $\rho_\alpha$ , определяющей плотность неспаренного электрона на  $\alpha$ -атоме углерода. Для данного радикала расчетное значение  $\rho_\alpha = 0.846$ . Используя методику определения углов по соотношению  $A_\beta/\rho_\alpha$ , предложенную в (Ruland et al., 1964), получили для протонов  $\text{CH}_2$ -группы углы, равные  $23^\circ$  и  $122^\circ$ . Несимметричность структуры  $\text{CH}_2$  объясняется эффективным отталкиванием электронной плотности от соседнего  $\gamma$ -углеродного атома.

Третий из обнаруженных радикалов, спектр которого представлен триплетом (рис.3.6в), образуется при обрыве концевой валентной связи одновременно с отмеченным перекисным радикалом:



Как видно из рис. 3.6в, дополнительное СТВ, вызывающее расщепление компонент триплета, также носит триплетный характер. Оно должно быть связано с двумя более удаленными протонами. Исходя из структуры полимерной цепи ПОБ, можно видеть, что ближайший протон не может дать такого вклада. Вероятно, он не участвует в

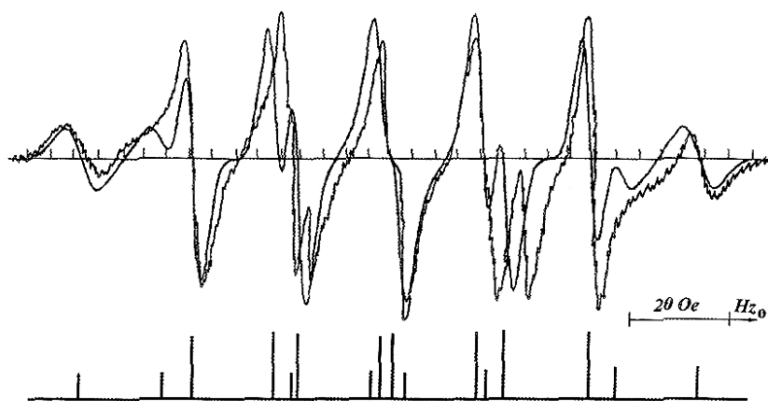


Рис. 3.7. Сравнение экспериментального спектра ЭПР полиоксипутирата с результатами компьютерного моделирования (Петраковская с соавт., 1995)

формировании спектра, следовательно, угол для него равен  $90^\circ$ .

Наличие динамических процессов в твердом ПОБ подтверждается данными ЯМР  $^1\text{H}$ . Спектры протонного магнитного резонанса твердого ПОБ изучены в диапазоне температур от жидкого азота до комнатной (рис. 3.8).

При низких температурах спектр ПМР представляет собой одиночную колоколообразную линию шириной около 10 Э. Такая линия типична для полимеров, содержащих  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$  протонные группировки, и свидетельствует об отсутствии протонной подвижности с частотами, превышающими 10 кГц (Слоним и Любимов, 1966). При 125 К в спектре зарегистрировано появление узкой (шириной около 1 Э) компоненты, интенсивность которой быстро возрастала с увеличением температуры, достигая 10 % общей интенсивности. Судя по низкой температуре начала сужения спектров и характеру их поведения в переходной области (123–143 К), отмеченная в ПОБ часть молекулярных фрагментов характеризуется интенсивной подвижностью.

Обнаруженная в ПОБ высокая протонная подвижность при низких температурах характерна для свежих образцов. Старение полимера (наблюдения охватывают период в четыре года) сопровождалось потерей эластичности и существенным (до 150 К) повышением температуры начала движения протонов. При этом, однако, скорости движения частиц молекулярных фрагментов превышали 10 кГц. Отмеченный эффект, вероятно, связан с кристаллизацией полимера. Степень кристалличности свежих образцов, как было установлено ранее (Фалалеев с соавт., 1994), составляла около 70 %, спустя четыре года, в «старых» образцах она возросла до 90 % (Волова с соавт., 2000).

Температура кристаллизации зависит не только от строения полимеров, но также и от скорости нагрева образца (таблица 3.2) (Ashraf et al., 1999; Withey and Hay, 1999). Поэтому реальная температура кристаллизации (температура «холодной» кристаллизации, полученная аппроксимацией при скорости охлаждения, стремящейся к нулю),

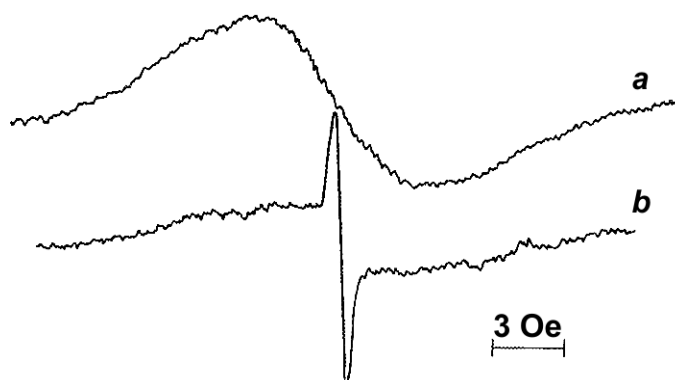


Рис. 3.8. Спектры ПМР твердого полиоксибутирата при азотной (а) и комнатной (б) температурах (Петраковская с соавт., 1995).

**Таблица 3.2**

**Влияние температуры на рост и размер сферолитов в полиоксибутирате  
(Ashraf et al., 1999)**

| Скорость роста сферолитов |                    | Размеры сферолитов |              |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Температура (°C)          | Скорость (мкм/сек) | Температура (°C)   | Размер (мкм) |
| 51                        | 1                  | 50                 | 0.07         |
| 65                        | 2                  | 65                 | 0.30         |
| 77                        | 3                  | 75                 | 0.50         |
| 92                        | 4                  | 85                 | 0.67         |
| 100                       | 3                  |                    |              |
| 106                       | 2                  |                    |              |
| 113                       | 1                  |                    |              |

оказывается значительно ниже. Установлено, что эта температура находится ниже 0°C (–2°C). В связи с этим заметный кристаллизационный процесс происходит даже при комнатной температуре при длительном хранении полимера. Столь низкие температуры кристаллизации ПОБ являются достаточно серьезной проблемой, так как несовершенная кристалличность и самопроизвольная кристаллизация ведут к потере таких важных свойств как эластичность, прочность. Полимер в таком режиме кристаллизации становится более твердым, хрупким, уменьшается его молекулярный вес, что говорит о деструкции мономолекулярных звеньев и цепей макромолекул.

Недавно при изучении структуры полиоксибутирата с использованием сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии установлены новые особенности: 1) образование сферолитов свободной спиральной структуры, повторяющей винтовую (спиральную) структуру природного полимера, происходит быстрее, чем образование сферолитов радиальной структуры; 2) в сборке сферолитных структур ламели ориентированы прямо к поверхности; 3) материал, кристаллизованный при высокой температуре, менее устойчив к травлению по сравнению с кристаллизованным при низких температурах (Shahin and Olley, 2002). Второй и третий феномены отличны от явлений в полимерах типа полиэтилена и полиэтилен терефталата и характерны для крайне свободных объемов (пространств) в материале, локализованном между основными сборками сферолитов. На рис. 3.9 показано изображение в отраженной оптической микроскопии сферолитов, образованных в тонких пленках прямо перед травлением. Видны более крупные спиральные сферолиты в центре, растущие при высокой температуре, ориентированные в направлении против часовой стрелки (рис. 3.10а). Малые сферолиты – противоположной ориентации (по часовой стрелке) (рис. 3.10б), окружающие крупные, образованы в течение двух недель последующей кристаллизации при низких температурах.

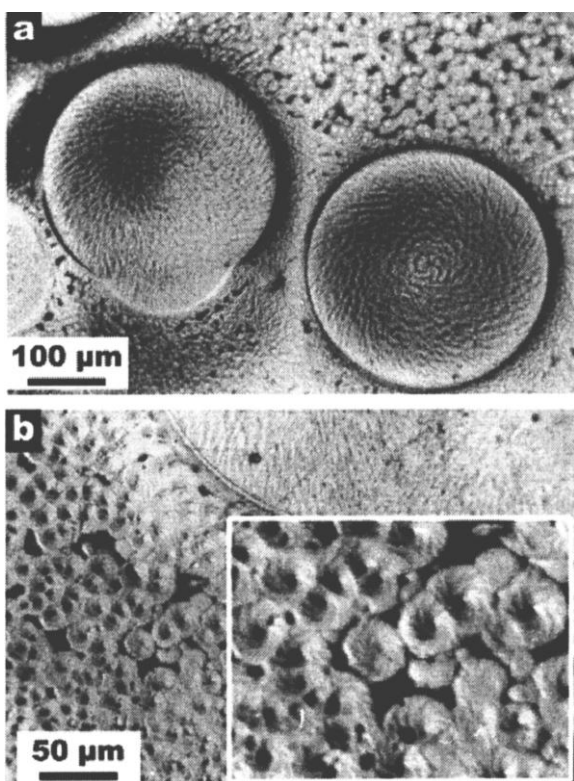


Рис. 3.9. Отраженная оптическая микрофотография ПОБ.  
 а – большие сферолиты, растущие изотермально при 120°C; б – малые сферолиты в охлажденном матриксе (Shahin and Olley, 2002).

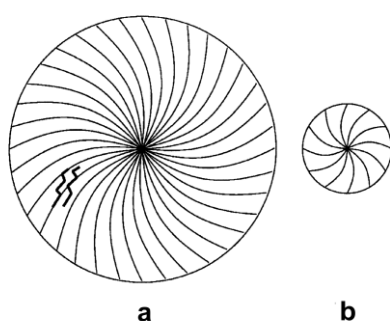


Рис. 3.10. Диаграмма структуры спиральных сферолитов (из рис. 3.9).  
 а – большие сферолиты, образованные при 120°C; б – малые сферолиты, растущие при комнатной температуре.

### 3.1.4. Молекулярная динамика полимерных макроцепей

Первое обстоятельство, которое следует учитывать при микроскопическом анализе полимеров, состоит в том, что макромолекулы, состоящие из связанных между собой мономерных звеньев, представляют из себя цепочечные структуры, обладающие конечной гибкостью. Основными гидродинамическими характеристиками полимерных макромолекул являются их поступательные, вращательные и более сложные конформационные движения, экспериментально исследуемые методами диффузии, седиментации, рассеяния света, осмометрии и вискозиметрии. В растворах в равновесном состоянии макромолекулы полимерных материалов могут образовывать различные конформационные структуры, зависящие от типа растворителя, длины и жесткости молекулярных цепей, химической структуры

мономолекулярных секторов. В области больших молекулярных масс для анализа внутримолекулярного состояния часто используются представления о конформациях в виде запутанных «клубков», при этом цепи повышенной жесткости образуют более рыхлую упаковку по сравнению с гибкоцепными полимерами. Как следствие этого, в жесткоцепных молекулах практически отсутствуют эффекты «исключенного» объема, поэтому их свойства очень мало будут зависеть от качества растворителя. В гибкоцепных молекулах растворитель, наоборот, оказывает определяющее влияние на гидродинамические и вязкоупругие характеристики.

Растворяется полимер в хлороформе, трихлорэтилене, дихлор-ацетате, трифлюороацетате, диметилформамиде, этил ацетацетате, камфаре, ледяной уксусной кислоте, 0.5 М феноле и М растворе едкого натра.

### *Поведение молекул ПОБ в растворах*

Фундаментальный вопрос о молекулярной структуре разбавленных растворов полиоксибутирата в хлороформе, трифлуороэтаноле, этилендихлориде в бинарной смеси дихлоруксусной кислоты наиболее подробно исследовался в работе (Akita et al., 1976). На основании многочисленных экспериментов впервые был получен ответ на вопрос, в каком конформационном состоянии могут находиться молекулы ПОБ?. Ранее считалось, что макромолекулы в растворах принимают спиральную конфигурацию, похожую на конформацию твердотельного состояния, однако, более детальный анализ показал, что система биополимер – растворитель может более адекватно интерпретироваться в рамках представления о конформационных беспорядочных «клубках» с исключением объема растворителя (Holmes, 1985), т. е. для типичных технологических режимов синтеза полимера ПОБ фактически реализуется гибкоцепная структура. Это подтверждается и тем, что экспериментально определенные характеристические вязкости растворов подчиняются универсальным степенным формулам Марка–Куна для вычисления среднего молекулярного веса  $M_B$ :

$$[\eta] = k \cdot M_B^\alpha.$$

Коэффициент  $\alpha = 0.74$  хорошо соответствует модели «клубков»,  $k$  – численный множитель. Модель полимерного «клубка», как деформируемой среды, является весьма перспективной для интерпретации и понимания поведения молекул полимера в самых разнообразных условиях.

Знание особенностей структурной организации макромолекул в растворах имеет важное значение для развития основ направленного биосинтеза полиоксибутирата и других ПОА. Дело в том, что в

процессе синтеза полимер уже на этапе зарождения находится в специфическом клубкообразном состоянии в цитоплазме клетки, и только в ходе экстракции полимера из биомассы клеток с использованием различных растворителей происходит формирование окончательной полукристаллической структуры полимера с конкретными значениями таких показателей, как характеристическая вязкость и молекулярный вес. Однако исследования влияния различных растворителей на молекулярную структуру ПОБ в зависимости от концентрации, способов растворения, температуры и других внешних условий крайне недостаточны.

### *Поведение макромолекул ПОБ в твердой фазе*

В твердых конденсированных фазах природа полимерного мезоморфизма заложена в значительной степени уже на молекулярном уровне мономерного звена и определяется химической структурой звена, молекулярной массой, характером внутримолекулярной конформационной подвижности структурных групп, типом фазового состояния полимера (кристаллическое, стеклообразное или аморфное), длиной цепи, температурой. В гетерополимерах важной характеристикой, определяющей их макроскопические физико-механические свойства, является композиционное распределение по длине цепи мономолекулярных единиц, входящих в состав сополимера (сополимеризация). Для полиокосиалканоатов многие из этих вопросов находятся только еще в начальной стадии изучения.

Хорошо известно, что динамическое поведение внутримолекулярных конформеров связано с процессами преодоления барьеров для внутреннего вращения молекулярных фрагментов. Эти барьеры определяются обычно кинетическими и спектроскопическими методами. Для биополимеров наибольшее развитие получили кинетические методы, к которым относятся методы ЯМР, ЭПР, диэлектрической или акустической релаксации. В экспериментах измеряются скорости перехода молекулы из одной равновесной конформации в другую. Если барьеры высоки, то вместо вращательных конформационных переходов проявляются конформационные гармонические колебания тех или иных фрагментов.

Для мономолекулярного звена молекулы ПОБ (рис. 3.11) три возможные изомерные конформации были выявлены методом ЯМР при измерении протонного спектра  $^1\text{H}$  (500 МГц) в дейтерохлороформе при комнатной температуре (Doi et al., 1989; Yoshie et al., 1992; Nakamura et al., 1992). Полученные спектры ЯМР показывают, что данный полимер ПОБ представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, одинаково ориентированными последовательными единицами D-(-)-3-оксимасляной кислоты.

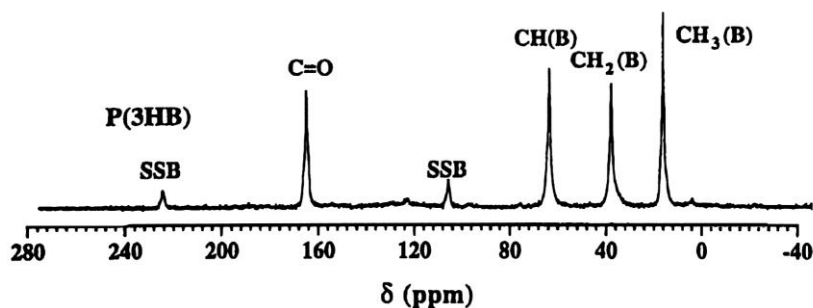


Рис. 3.11.  $^{13}\text{C}$  спектр поли-3-оксибутирата (ЗПОБ) (Cao et al., 1999).

Учитывая конформационную структуру мономолекулярных звеньев, в принципе можно понять химическое строение кристаллической фазы ПОБ, которое было определено еще в ранних работах, (см., например, Marchessault et al., 1988). В направлении (с) полимерная цепь представляет из себя спираль с периодом 5.96 Е, а в направлении (b) в дополнение к представленной располагаются еще две подобные спирали с другими конформационными поворотами, повторяющимися через  $b = 13.2$  Е. Более подробная пространственная химическая схема кристаллизованных цепей приведена в работе (Holmes, 1988).

### 3.1.5. Молекулярная масса ПОБ

Молекулярная масса ПОБ может составлять от нескольких сотен до миллионов Da с полидисперсией от 2.3 до 3.2. Эта величина зависит от типа используемого продуцента, условий его выращивания, а также метода экстракции полимера из биомассы и применяемых при этом растворителей (Dawes, 1990; Doi, 1995). Молекулярная масса полимера является очень важным параметром, так как определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. Поэтому данному параметру уделяется существенное внимание. Известно, что механическая прочность ПОБ существенно уменьшается, если его молекулярная масса составляет менее 400 000 Da, так при низких значениях параметра ( $M_v$  200 000 Da) полимер очень хрупкий (Cox, 1994).

Установлено, что влияние источника углеродного питания на молекулярную массу синтезируемого микроорганизмами полиоксибутирата может быть значительным. Например, штаммы *Azotobacter vinelandii* синтезируют полиоксибутират с высокой молекулярной массой и низкой дисперсией при росте организмов на мелассе; величина  $M_v$  при этом достигает 4 000 000 Da (Chen, Page, 1994). Метилотрофные бактерии, главным образом с сериновым путем, в подавляющем большинстве случаев при росте на метаноле синтезируют полиоксибутират низкой молекулярной массы (40 000–60 000

(Ueda et al., 1996). При исследовании зависимости данного параметра от условий культивирования ПОБ-синтезирующих микроорганизмов на примере *R. eutropha* установлено, что степень полимеризуемости ПОБ главным образом зависит от концентрации источника углерода (Anderson et al. 1992; Taidi et al., 1994). Показано, что при росте данного организма на смесях фруктозы и пентановой кислоты в хемостате с увеличением скорости потока молекулярная масса синтезируемого сополимера 3-ПОБ-со-3-ПОВ возрастает (Koyama, Doi, 1995). В других работах зарегистрировано, что степень полимеризуемости ПОБ, синтезируемого *R. eutropha* зависит от концентрации биогенных элементов (азота, магния, фосфора), а также возраста культуры (Kawagushi et al., 1992). Авторы отмечают необходимость оперативного слежения за этим параметром, особенно в конце ферментационного цикла, на стационарной фазе, когда активизируются эндогенные деполимеразы.

Образцы полиоксибутирата, синтезированные трансгенными организмами, могут иметь различные значения молекулярного веса в зависимости от типа продуцента и условий культивирования. Например, *E.coli*, трансформированная генами системы синтеза ПОА из *Ralstonia*, в зависимости от фазы ассимиляции полимера и pH среды синтезирует ПОБ с молекулярным весом от 0.5 до 20 000 Da (Kusaka et al., 1997), а трансгенные высшие растения, например, *Arabidopsis thaliana* и *Brassica napus*, способны синтезировать полиоксибутират с молекулярным весом до 1 000 000 Da и выше (Poirier, 1999).

### 3.1.6. Температурные свойства ПОБ

У полиоксибутирата, аналогично многим полимерным материалам, температура, при которой происходит их деформация, несколько ниже температуры кипения (температурной деградации), поэтому газовое состояние в полимерах не реализуется и основным видом фазового равновесия в них является конденсированное состояние – кристаллическое, стеклообразное, вязко-текучее и жидкое. Способность ПОБ кристаллизоваться определяется внутренними свойствами его цепей и характеризуется температурой кристаллизации  $T_c$ . Во многих полимерах, как известно, кристаллизация обычно осуществляется, но из-за ряда причин она зачастую захватывает не весь объем материала. Поэтому в большинстве случаев полимеры представляют из себя полукристаллические объекты. Именно к таким полукристаллическим материалам относится и полиоксибутират.

Температурные характеристики ПОБ и способность кристаллизоваться в нативном состоянии являются наиболее значимыми параметрами, так как определяют термомеханические свойства и, следовательно, возможности переработки полимера в специальную продукцию и изделия. Макроскопические свойства полимерных материа-



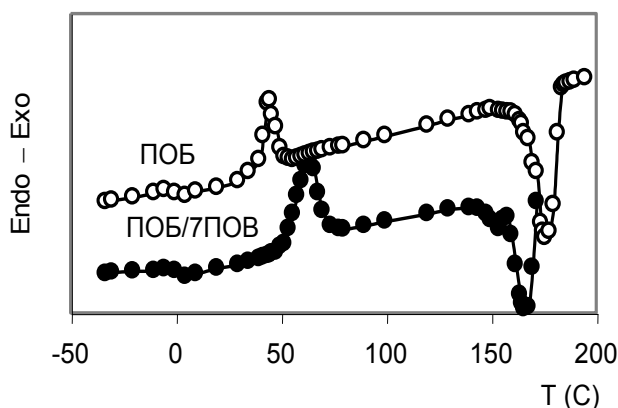


Рис. 3.12. ДТА термограммы для аморфных образцов полиоксибутирата (ПОБ) и сополимера ПОБ с 7 мол. % оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ) при скорости нагрева 10°С/мин. (Ashraf et al., 1999).

лов определяются, как известно, их химическим строением и фазовым состоянием, которые применительно к ПОБ и другим полиоксиданам изменяются в достаточно широких пределах.

Динамика температуры последовательных фазовых переходов исследована для ПОБ методом дифференциального термического анализа (ДТА) (Yuan et al., 1997; Ashraf et al., 1999). Температуры последовательных фазовых переходов, определенные методом дифференциального термического анализа (ДТА) приведены для ПОБ и сополимера ПОБ с оксивалератом (включение оксивалерата 7 мол. %) на рис. 3.12.

На термограммах при температурах  $-10^{\circ}\text{C} < T < 10^{\circ}\text{C}$  идентифицирован пик перехода из стеклообразного состояния в более подвижное аморфное. Следующий пик в области  $+50^{\circ}\text{C}$  соответствует кристаллизации, и далее следует пик в точке плавления. Для гомогенного полиоксибутирата температура плавления лежит в диапазоне  $176\text{--}180^{\circ}\text{C}$ ; температура начала кристаллизации находится в области  $47^{\circ}\text{C}$ , соответственно.

Механизм термической деградации ПОБ в общем виде изучен и представляется в виде процесса первичного разрыва полимерной цепи в реакции  $\beta$ -элиминации (Billingham et al., 1978). Термическая деградация ПОБ при температуре около  $300^{\circ}\text{C}$  ведет к образованию продуктов пиролиза, главным образом олигомеров и в небольших количествах – изокротоновой кислоты. Из этих продуктов в результате их разложения образуются вторичные продукты деградации, среди которых идентифицированы ацетальдегид, пропилен, кетены и  $\text{CO}_2$ . Отрывы кротоната в процессе деградации со временем ведут к конденсации и увеличению концентрации карбоксильных групп, что вызывает значительное снижение молекулярного веса полимера.

## 3.2. Многокомпонентные полиоксиалканоаты

Важным моментом для характеристики гетерополимерных полиоксиалканоатов является вопрос о композиционном распределении мономеров. Понимание механизма данного явления позволяет, как выявлено в работе (Сао, 1999) прояснить такие важные моменты, как закономерности образования концентрационных областей (сокристаллизованных и блочных), структура аморфной и кристаллической фаз, появление концентрационных эффектов подавления кристаллизации и ограничение образования малокомпозиционных сополиэфиров. Анализ литературы свидетельствует о том, что эффекты внутримолекулярного движения в различных со-полиэфирах практически всегда тесно связываются с процессами сокристаллизации и структурой макромолекулярных цепей. Это является фундаментальным свойством полимеров и именно в плане поиска корреляций между молекулярными движениями и процессами кристаллизации проводится большое число экспериментальных исследований.

### 3.2.1. Сополимеры 4-ПОБ-со-3-ПОБ

Установлено, что полимер 4-оксимасляной кислоты, в отличие от поли-3-оксибутирата (рис. 3.13), является высокоэластичным и гибким полимером, у которого удлинение при разрыве составляет до 1000 % (на 2 порядка выше, чем у 3-ПОБ). Сополимеры поли(3-ОВ-

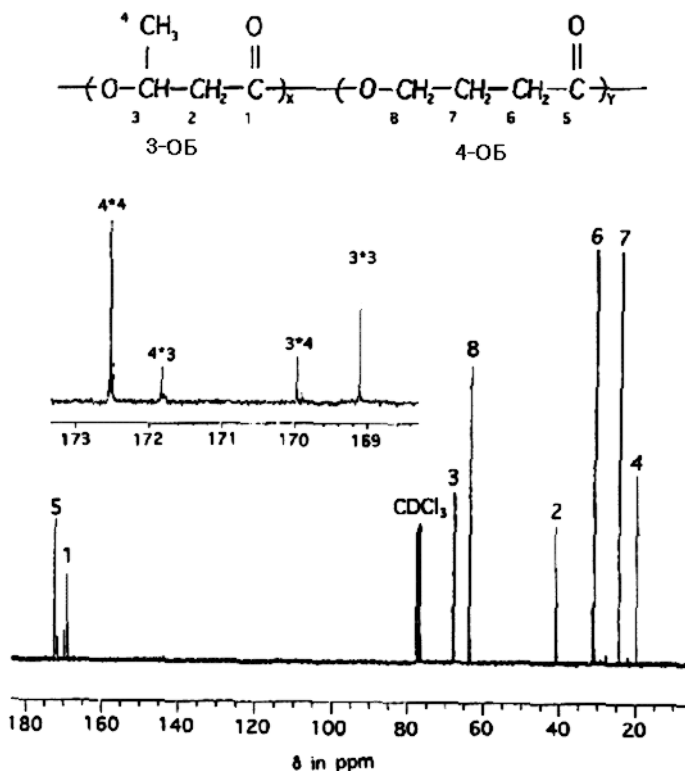


Рис. 3.13.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр сополимера (3-оксибутирата-со-65 мол. % 4-оксибутирата) (Mitomo et al., 2001)

со-4-ОБ) представляют собой серию материалов с различающимися физико-механическими свойствами. На примере образцов поли(3-ОБ-со-4-ОБ), синтезированных *Comamonas acidovorans*, установлено, что при 20–40 мол. % 4-оксибутирата сополимеры подобны эластичным резинам; при возрастании фракции 4-оксибутирата от 0 до 49 мол. % кристалличность данного сополимера снижается от 60 до 14 % (Saito and Doi, 1994; Saito et al., 1996). У этого типа сополимеров (при доле фракции 4-оксибутирата от 0 до 29 мол. %) наблюдали только один тип кристаллической решетки (типа поли-3-оксибутирата). В отличие от этого, тип поли-4-оксибутиратной решетки зафиксирован для этих сополимеров при высоких долях фракции 4-оксибутирата (78–100 мол. %). При таком составе полимера скорость роста кристаллов падает, предположительно, в результате того, что единицы 4-оксибутирата не включаются в решетку 3-оксибутирата (Saito and Doi, 1994; Saito et al., 1996). Параметры кристаллической решетки поли-4-оксибутирата следующие:  $a = 7.75 \text{ \AA}$ ,  $b = 4.79 \text{ \AA}$ ,  $c = 11.94 \text{ \AA}$  (Mitomo et al., 2001).

Четкой зависимости между соотношением мономеров 3-ОБ и 4-ОБ и молекулярным весом материала не выявлено, однако существенное влияние фракции 4-оксибутирата на температурные свойства обнаружено (Mitomo et al., 2001) (таблица 3.3).

Температура плавления сополимеров этого типа с увеличением фракции 4-оксибутирата может изменяться от 178 до 130°C и ниже (рис. 3.14). Температура стеклования с увеличением доли 4-оксибутирата от 0 до 100 мол. % резко падает, от 4 до –46 – –48°C.

**Таблица 3.3**

**Свойства сополимеров 3-оксибутирата-со-4оксибутирата (Mitomo et al., 2001)**

| Соотношение<br>3ОБ/4ОБ<br>(мол. %) | Молекулярный<br>вес<br>$M_b$ (Da) | Кристал-<br>личность,<br>$C_x$ (%) | Температурные характеристики |               |                                     |
|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------|-------------------------------------|
|                                    |                                   |                                    | $T_{пл}$ (°C)                | $T_{ст}$ (°C) | Энергия<br>кристаллизации<br>(Дж/г) |
| 100/0                              | 580 000                           | 72                                 | 176                          | 4             | 90                                  |
| 81/19                              | 660 000                           | 40                                 | 158                          | –4            | 45                                  |
| 62/38                              | 370 000                           | 18                                 | 118                          | –6            | 6                                   |
| 35/65                              | 910 000                           | 27                                 | 115                          | –40           | 11                                  |
| 26/74                              | 520 000                           | 33                                 | 44                           | –43           | 22                                  |
| 6/94                               | 420 000                           | 54                                 | 54                           | –46           | 39                                  |

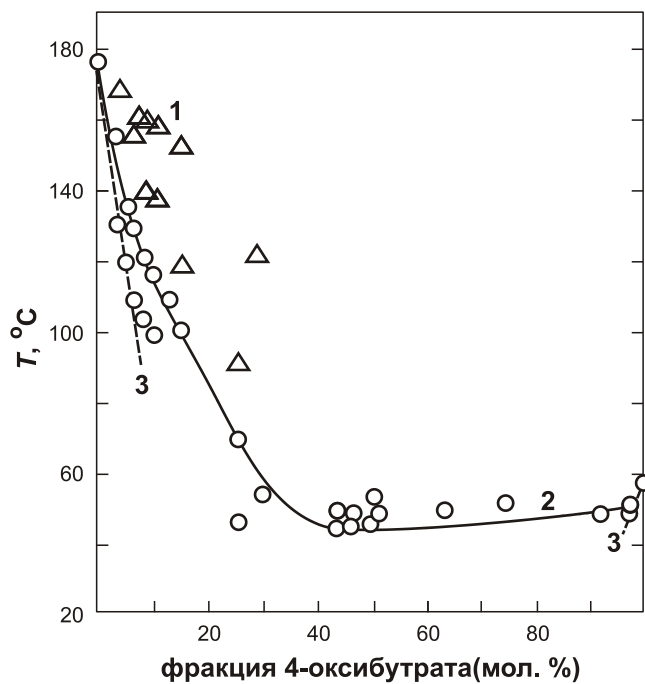


Рис. 3.14. Зависимость температуры плавления ( $T_{пл}$ ) сополимера (3-ОБ-со-4-ОБ) от фракции 4-оксибутирата: 1, 2 и 3, соответственно, медленное, среднее и резкое изменение (Mitomo et al., 2001).

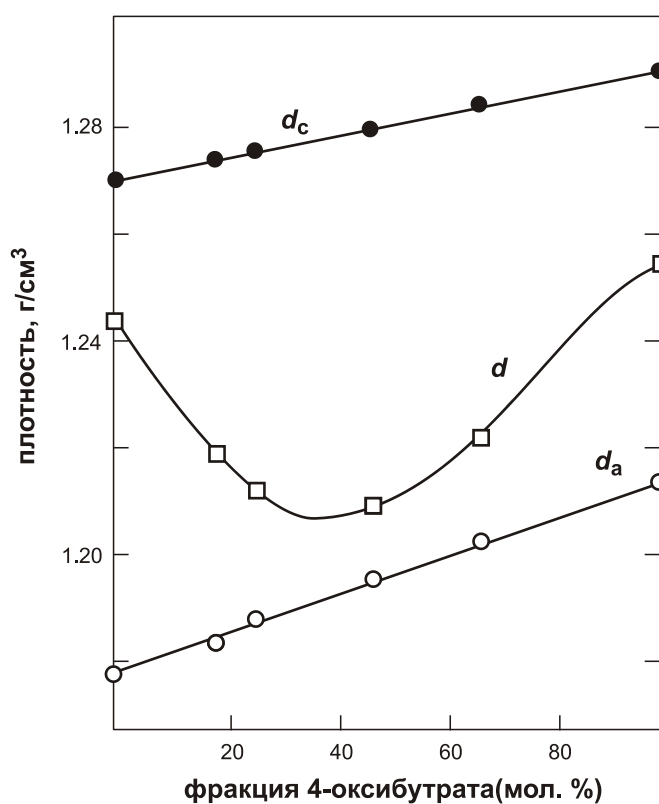


Рис. 3.15. Зависимость плотности, сополимера (3-ОБ-со-4-ОБ,) определяемой соотношением аморфной и кристаллической фаз, от фракции 4-оксибутирата:  $d$  – плотность сополимера,  $d_c$  – плотность кристаллической фазы,  $d_a$  – плотность аморфной фазы (Mitomo et al., 2001.)

**Таблица 3.4**

**Свойства сополимеров поли(3ОБ-со-4ОБ) в сравнении с поли-3-оксибутиратом (Lee, 1996)**

| Полимер             | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | $T_c, ^\circ\text{C}$ | Модуль Юнга, ГПа | Кристалличность, % | Прочность на растяжение, МПа |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|------------------------------|
| <b>(3-ПОБ)</b>      | 179                      | 2                     | 3.5              | 70                 | 40                           |
| <b>3-ПОБ-4-ПОБ:</b> |                          |                       |                  |                    |                              |
| 3 мол. % 4-ПОБ      | 166                      | -7                    | -                | 45                 | 28                           |
| 10 мол. % 4-ПОБ     | 159                      | -                     | -                | -                  | 24                           |
| 16 мол. % 4-ПОБ     | -                        | -                     | -                | -                  | 26                           |
| 64 мол. % 4-ПОБ     | 50                       | -                     | 30               | -                  | 17                           |
| 90 мол. % 4-ПОБ     | 50                       | -                     | 100              | -                  | 65                           |
| <b>4-ПОБ</b>        | 53                       | -36                   | 149              | -                  | 104                          |

Разрывная прочность пленок с увеличением фракции 4-оксибутирата от 0 до 16 мол. % падает от 43 до 26 МПа с увеличением удлинения при разрыве от 5 до 144 %. Однако при увеличении фракции 4-оксибутират в диапазоне 64–100 мол. % разрывная прочность возрастает от 17 до 104 МПа (Saito and Doi, 1994; Saito et al., 1996).

Показатели физико-механических свойств данного сополимера в зависимости от соотношения мономеров 3-ОБ и 4-ОБ представлены в таблице 3.4, а на рис. 3.15 – зависимость его плотности.

Как видно из представленных данных, на базе данного сополимера в зависимости от соотношения фракций можно получать материалы с различными характеристиками.

### 3.2.2. Сополимеры 3-ОБ-со-3-ОБ

Вторым после полиоксибутирата, наиболее изучаемым представителем семейства ПОА является сополимер оксибутирата с оксивалератом (рис. 3.16). Сополимеры оксибутирата и оксивалерата поли-(3-ОБ-со-3-ОБ) (или 3ПОБ-со-3ПОВ) – изодиморфны вследствие сокристаллизации (Bluhm et al., 1986; Scandola et al., 1992). При изменении соотношения мономеров в данном сополимере имеют место изменения в кристаллической решетке. Если содержание оксивалерата менее 40 мол. %, мономеры оксибутирата могут кристаллизоваться в решетке оксибутирата; если содержание оксивалерата превышает 40 мол. %, мономеры оксибутирата могут кристаллизоваться в решетке оксивалерата. Таким образом, изодиморфизм влияет на уровень кристалличности сополимера. Однако, несмотря на изодиморфизм, сополимеры 3-оксибутирата-со-3-оксивалерата сохраняют химические свойства кристаллического гомогенного поли-

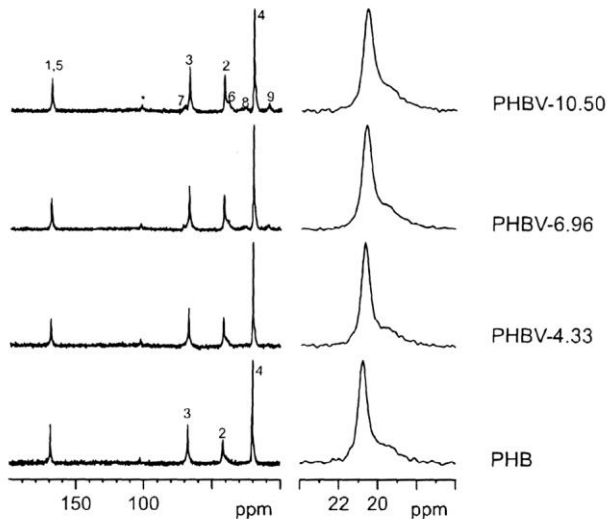
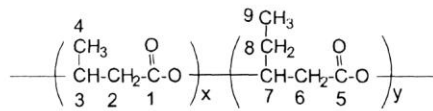


Рис. 3.16.  $^{13}\text{C}$  масс-спектр сополимеров ПОВ-со-ПОВ с различным включением оксивалерата в сопоставлении с ПОВ. Справа представлены спектры метиловых групп (Chen et al., 2002).

оксибутирата. Обе мономерные единицы (3-оксибутирата и 3-оксивалерата) имеют сходные формы и занимают одинаковые объемы. Конформация полимерных цепей обоих мономеров совместима с обеими типами кристаллической решетки. Цепь оксивалерата, аналогично цепи оксибутирата, имеет  $2_1$  спиральную конформацию, а орторомбические ячейки в решетке при пространстве группы  $P2_12_12_1$  – сходные параметры ячейки (Yokouchi et al., 1974). Кристалличность ПОВ-со-ПОВ ниже, чем у ПОВ и в зависимости от соотношения мономеров может лежать в диапазоне 39–69 % (Poiger et al., 1995). Плотность аморфной и кристаллической фаз у данного сополимера, составляет, соответственно, 1.16 и 1.2 г/см<sup>3</sup> (Waddington, 1994; Poiger et al., 1995).

Механические свойства ПОВ-со-ПОВ также в зависимости от состава могут существенно изменяться. С увеличением доли оксивалерата материал становится менее кристаллическим и более эластичным.

Установлено, что при уровне оксивалерата в сополимере, равным 20–40 мол. %, оксивалератные мономеры частично исключаются из решетки оксибутирата (Токива et al., 1992). Показано также, что сокристаллизация оксибутиратных и оксивалератных мономеров, безусловно, имеет место, однако молярное соотношение оксивалерата внутри кристаллов приблизительно составляет 2/3 от общего молярного соотношения мономеров в сополимере (Pouton and Akhtar, 1996).

Включение оксивалерата в полиоксибутират существенно влияет на кинетику кристаллизации материала, включая скорость про-

**Таблица 3.5**

**Влияние содержания оксивалерата в сополимере ПОБ-со-ПОВ  
на максимальную скорость кристаллизации (Akhtar et al., 1992)**

| Состав полимера   | Максимальная скорость кристаллизации, мм/сек | Температура кристаллизации, $T_k$ (°C) | Температура плавления, $T_{пл}$ (°C) |
|-------------------|--|--|--------------------------------------|
| 3(ПОБ)            | 4.50   | 88                                     | 197                                  |
| 3(ПОБ-со-6 %ПОВ)  | 1.40   | 80                                     | 186                                  |
| 3(ПОБ-со-12 %ПОВ) | 0.43   | 78                                     | 173                                  |
| 3(ПОБ-со-16 %ПОВ) | 0.23   | 70                                     | 167                                  |

цесса и размер образующихся сферолитов (Akhtar et al., 1992) (таблица 3.5) Процесс кристаллизации ПОА также существенно зависит от температуры среды.

Динамика температуры последовательных фазовых переходов исследована для сополимеров оксибутирата и оксивалерата различного состава (Yuan et al., 1997; Ashraf et al., 1999). Для сополимера температура плавления ниже пика плавления полиоксибутирата, и это снижение тем значительнее, чем выше фракция оксивалерата в полимере (рис. 3.17). Температура начала кристаллизации сополимеров лежит около 62°C.

Как было показано выше, низкие температуры кристаллизации гомогенного ПОБ являются достаточно серьезной проблемой для его переработки и последующего использования. Одним из возможных путей увеличения температуры кристаллизации данных полимеров

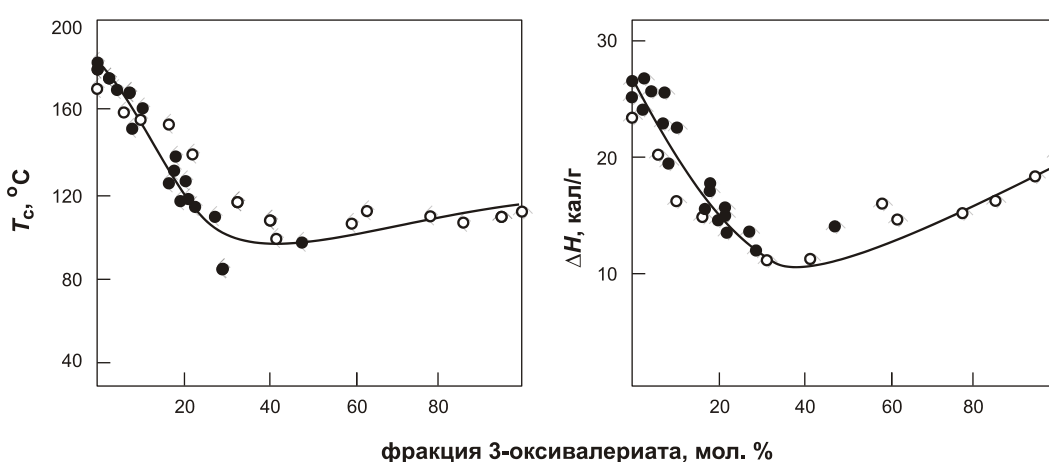


Рис. 3.17. Зависимость температуры кристаллизации и теплоты кристаллизации сополимеров 3-оксибутирата-со-3-оксивалерата от фракции 3-оксивалерата (Blombergen et al., 1986).

является направленный синтез сополимеров, ориентированный на включение в полимерные цепи оксивалерата. Так, при 20 %-м содержании оксивалерата в сополимере с оксибутиратом температура кристаллизации возрастает до  $T = 82^{\circ}\text{C}$ , но при этом, однако, существенно увеличивается время кристаллизации, а это является весьма критичным для специфических условий промышленного литья.

Показано, что изменение температуры плавления в ПОБ-со-ПОВ может быть описано с помощью соотношения Nishi–Wang (Scandola et al., 1997):

$$\frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_0} - \frac{R}{\Delta H} \frac{V_2}{V_1} \chi_{12} \phi^2,$$

где:  $T_m$  и  $T_0$ , соответственно, – температуры плавления гетерополимера и чистого ПОБ,  $V_1$  и  $V_2$  – молярные объемы,  $\Delta H$  – энтальпия,  $\chi_{12}$  – параметр взаимодействия полимер–полимер Флори – Хаггиенса и  $\phi$  – объемная фракция. В первом приближении изменение температуры от объемной фракции ПОВ является линейной функцией  $T(\phi)$ .

Собственно процесс кристаллизации в ПОБ-со-ПОВ во многом зависит как от температуры, так и от режимов отжига (Mitomo and Doi, 1999). Количественной мерой процесса кристаллизации  $X_t$  может служить уравнение Авраами (An, Dong et al., 1999):

$$\ln(1 - X_t) = -Z,$$

где  $t$  – время кристаллизации,  $Z$  – константа, характеризующая скорость кристаллизации и  $n$  – механистический числовой параметр, который определяется при исследовании скорости и объема кристаллизации.

Значение  $n$  меняются от 3.8 до 2.0 и с увеличением фракции оксивалерата от 0 до 10 и 24 % в составе сополимера. По данным (Withey, Nau, 1999) эти значения находятся в пределах между 2.5 и 3.0 для 1 % смесей ПОБ-с-ПОВ. Можно отметить, что выявленная тенденция к более качественной кристаллизации в сополимерах ПОБ-со-ПОВ, хотя и показана, тем не менее для промышленных целей кристаллизационные и физико-механические параметры данных сополимеров еще не являются достаточными.

Водородными бактериями *R. eutropha* В 5786 синтезировано семейство сополимеров оксибутирата с оксивалератом с различным соотношением мономеров с целью исследования их физико-химических свойств (Волова с соавт. 1992; 1998; Фалалеев с соавт., 1994).

На рис. 3.18 представлены хроматограммы ПОБ-со-ПОВ, с различным включением оксивалерата; результаты идентификации метиловых эфиров оксибутирата и оксивалерата иллюстрируются снятыми масс-спектрами (рис.3.19–3.20).



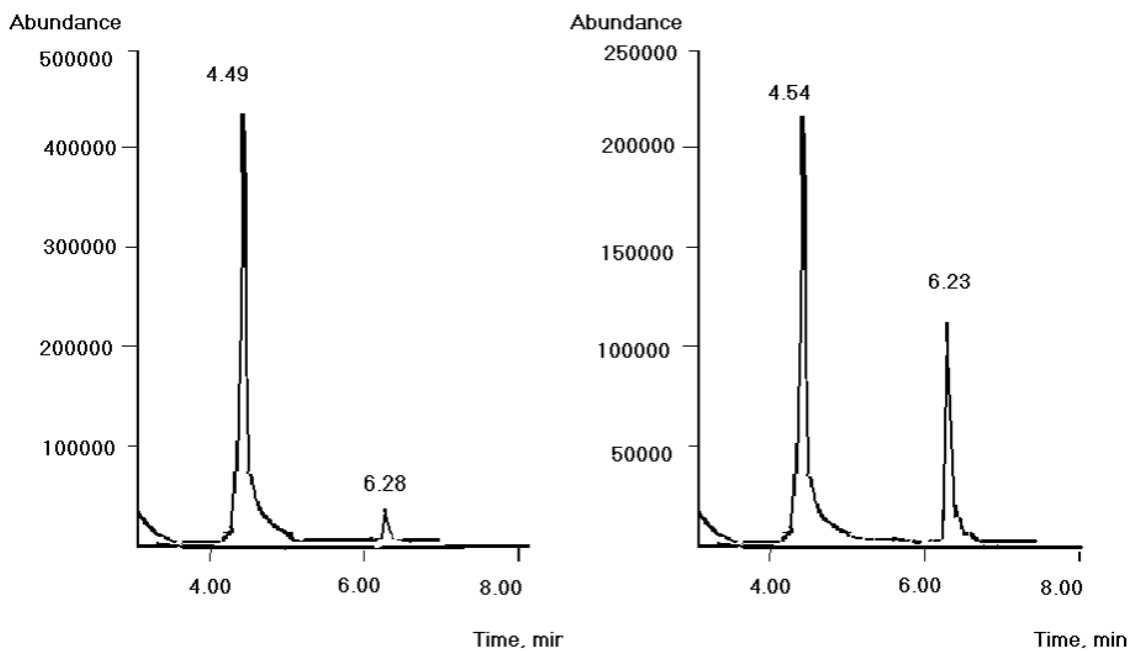


Рис. 3. 18. Хроматограмма, характеризующая химический состав (ПОБ-со-ПОВ), синтезированных *Ralstonia eutropha* В 5786, с включением оксивалерата 8 и 25 мол. % (пики метиловых эфиров  $\beta$ -оксибутирата (4.49–4.632) и  $\beta$ -оксивалерата (6.21–6.28) (Волова с соавт., 1992; 1994).

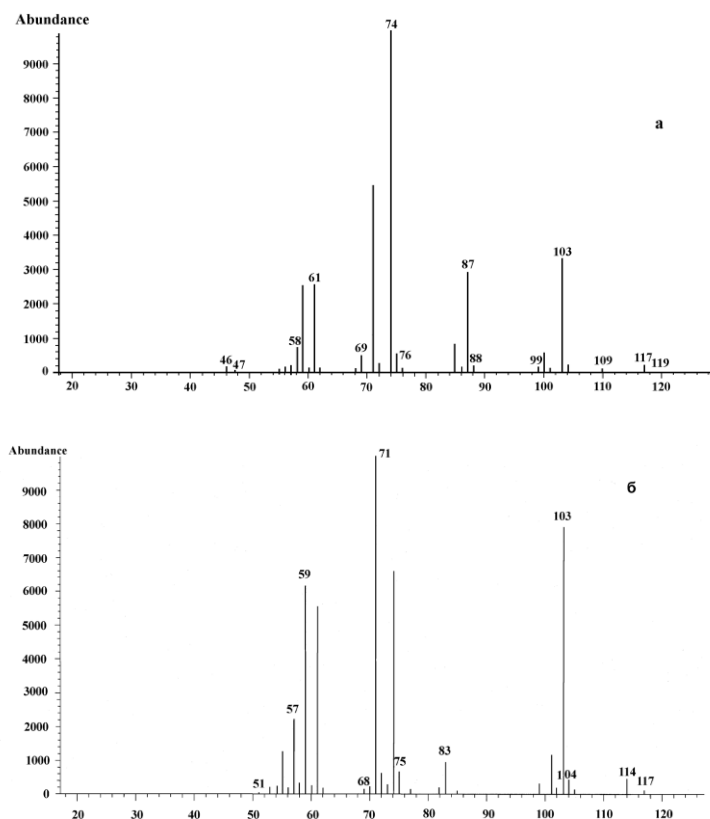


Рис. 3.19–3.20. Масс-спектры метиловых эфиров  $\beta$ -оксибутирата и  $\beta$ -оксивалерата, входящих в состав ПОА.

**Таблица 3.6**

**Физико-химические свойства полиоксипалканоатов, синтезированных  
*Ralstonia eutropha* В 5786 (Волова с соавт., 2001)**

| Образцы  | $M_w$ (D) | $C_x$ (%) | $T_{пл}$ (°C) | $T_{дегр}$ (°C) |
|--|-----------|-----------|---------------|-----------------|
| ПОБ  | 218 000   | 78        | 182           | 278             |
| ПОБ-со-ПОВ<br>(включение валерата – 4 мол. %)  | 107 000   | 65        | 172           | 254             |
| ПОБ-со-ПОВ<br>(включение валерата – 18 мол. %) | 340 100   | 58        | 170           | 240             |
| ПОБ-со-ПОВ<br>(включение валерата – 25 мол. %) | 216 200   | 55        | 162           | 218             |

Для сополимерных образцов в целом характерны более низкие значения температуры плавления ( $T_{пл}$ ) и деградации ( $T_{дегр}$ ) (таблица 3.6).

Включение оксивалерата влияет также на степень кристалличности ПОА в диапазоне величины фракции от единиц до 20–30 мол. % (рис. 3.21); с ростом доли оксивалерата кристалличность материала снижается. Температура размягчения ПОБ ( $T_p$ ) лежит в диапазоне 110–115°C, плавления ( $T_{пл}$ ) 170–185°C, разложения ( $T_{разл}$ ) 270–305°C. Существенных различий в термическом поведении ПОБ на воздухе и в атмосфере инертной среды (азот) не выявлено. Для сополимеров ПОБ/ПОВ в целом характерны более низкие значения параметров, снижающиеся с увеличением доли оксивалерата (рис. 3.22).

Четкой связи между химическим составом ПОА и величиной  $M_w$  не установлено. Образцы, взятые для исследования и получения пленок и нитей имели  $M_w$  350 000–450 000 Da.

Следует отметить, что образцы сополимеров с более высоким содержанием оксивалерата, свыше 40–50 мол. %, имели значения кристалличности около 50 %, что близко к показателю у сополимеров с содержанием данной фракции от 15 до 25 мол. %. Видимо, имеет место сокристаллизация мономерных единиц в одну решетку, в дан-

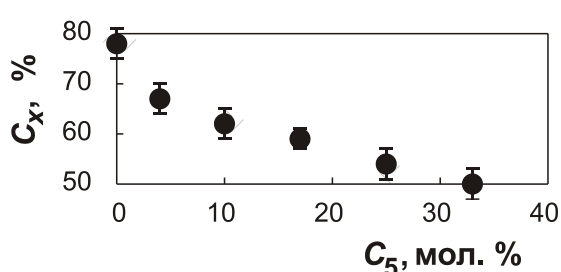


Рис. 3.21. Зависимость степени кристалличности от включения оксивалерата

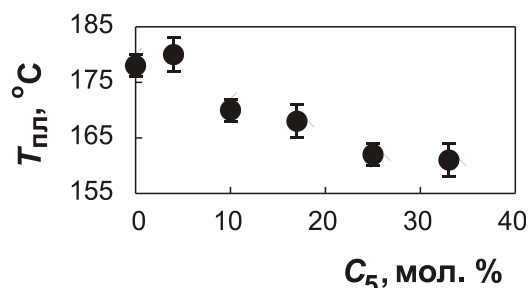


Рис. 3.22. Зависимость температуры плавления от включения оксивалерата

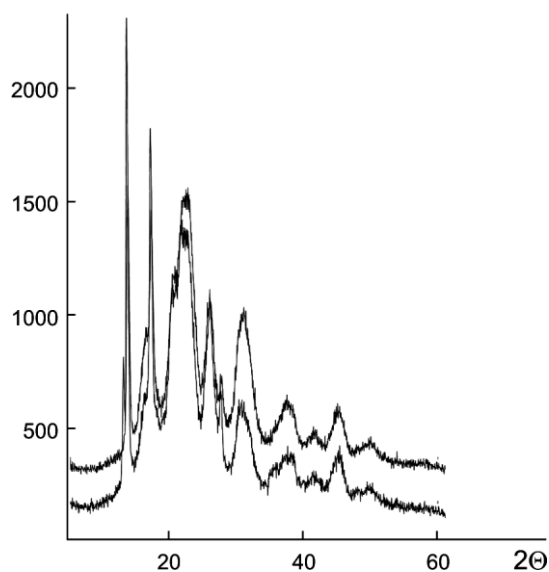


Рис. 3.23. Рентгеновские спектры ПОБ-со-ПОВ, синтезированного *Ralstonia eutropha* В 5786, с содержанием оксивалерата 58 и 63 мол. %;  $C_x$ , соответственно, 54 и 51 % (Volova et al., 2002).

ном случае, оксивалерата, что не сказывается на соотношении аморфной и упорядоченной фаз и не влияет на кристалличность материала, несмотря на рост доли оксивалерата. На рис. 3.23 представлены спектры сополимеров оксибутирата с включением оксивалерата свыше 50 мол. %.

Физико-механические свойства 3(ПОБ-со-ПОВ) отличаются от 3-ПОБ (таблица 3.7) и существенно зависят от соотношения мономерных фракций.

Как уже указывалось, важным моментом при анализе структуры и свойств гетерополимерных полиоксикалкоанатов является вопрос о композиционном распределении мономерных единиц в них.

В отличие от гомополимерного ПОБ, в сополимерах оксибутирата и оксипропионата явления сокристаллизации фактически не про-

**Таблица 3.7**  
**Влияние содержания 3-оксивалерата на свойства сополимеров ПОБ-со-ПОВ (Lee, 1996a)**

| Полимер         | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | $T_c, ^\circ\text{C}$ | Модуль Юнга, ГПа | Кристалличность, % | Прочность на растяжение, МПа |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|------------------------------|
| (3-ПОБ)         | 179                      | 2                     | 3.5              | 70                 | 40                           |
| 3-ПОБ-со-3-ПОВ: |                          |                       |                  |                    |                              |
| 3 мол. % 3-ПОВ  | 170                      | -1                    | 2.9              | 69                 | 38                           |
| 9 мол. % 3-ПОВ  | 162                      | -                     | 1.9              | 62                 | 37                           |
| 14 мол. % 3-ПОВ | 150                      | -                     | 1.5              | 56                 | 35                           |
| 20 мол. % 3-ПОВ | 145                      | -                     | 1.2              | 50                 | 32                           |
| 25 мол. % 3-ПОВ | 137                      | -                     | 0.7              | -                  | 30                           |

исходит, а самостоятельные блоки поли(3-пропионата) не обнаружены в кристаллической фазе и составляют аморфные области с другой структурной единицей. Отсутствие сокристаллизации в данной системе связано, по-видимому, с большой разницей в молекулярной подвижности ячеек 3-ПОБ и 3-ПОП (Сао, 1999). Обнаружено, что по мере возрастания содержания пропионата в полимере усиливается подавление кристаллизации; поэтому данный материал, аналогично, ПОБ-со-ПОВ менее кристалличесок по сравнению с ПОБ. Установлено, что для формирования кристаллитов необходимо, чтобы в молекулярных цепочках подряд располагались не менее двух звеньев 3-гидроксипропионата. Необходимость этого можно понять с позиций существования неодинаковой молекулярной подвижности бутират- и пропионат-блоков.

Рентгеноструктурный анализ полимерных пленок, полученных поливом из растворов сополимеров 3-оксибутирата с 3-оксипропионатом с различным включением 3-оксипропионата (от 0 до 100 мол. %), показал, что образование кристаллической решетки имеет место только в сополимерах, у которых фракция 3-оксипропионата составляет свыше 43 мол. % (Shimamura et al., 1994; Doi et al., 1996). Однако дальнейшее увеличение содержания 3-оксипропионата в сополимере свыше 43 мол. % мало влияло на параметры кристаллизации полимера. При увеличении пропионатной фракции от 0 до 67 мол. % степень кристаллическости падала от 60 до 7 %. Предполагается, что это происходит в результате не включения оксипропионатных мономеров в решетку оксибутирата. Методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии показано отсутствие явления сокристаллизации мономеров оксибутирата и оксипропионата (Ichikawa et al., 1996).

### 3.2.3. Сополимеры 3-ПОГ-со-3-ПОО

Другой тип ПОА, сополимеры оксигексаноата и оксиоктаноата, также относящийся к среднецепочечным полиоксиалканоатам, имеет довольно низкую температуру плавления и подобен эластичной резине (таблица 3.8). Сополимеры оксибутирата с оксигексаноатом имеет другие свойства. Например, степень кристаллическости данных сополимеров снижается от 60 до 18 % по мере увеличения фракции оксигексаноата от 0 до 25 мол. %. Степень влияния мономеров оксигексаноата на кристаллографические параметры сополимера незначительны, предположительно, в результате того, что единицы оксигексаноата не включаются в решетку оксибутирата. Скорость роста кристаллов в этом материале значительно снижается при увеличении оксигексаноатной фракции. Статистически случайное включение оксигексаноатных мономеров в сополимерную цепь оксивалерата резко снижает скорость размещения сегментов 3-оксибутирата при образовании кристаллических ламилей (Doi et al., 1995).

**Таблица 3.8**  
**Свойства полиоксисалканоатов различного состава (Lee, 1996 а)**

| Полимер        | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | $T_{ст}, ^\circ\text{C}$ | Модуль Юнга, ГПа | Кристалличность, % | Прочность на растяжение, МПа |
|----------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--------------------|------------------------------|
| (3-ПОБ)        | 179                      | 2                        | 3.5              | 70                 | 40                           |
| 3-ПОГ-со-3-ПОО | 61                       | –                        | –                | 30                 | 10                           |

Температурные свойства полиоксисалканоатов и кинетика кристаллизации определяют базовые физико-механические свойства. Включение в полимерную цепь 3-полиоксибутирата оксипроизводных жирных кислот различной структуры в качестве вторых сополимерных единиц кардинально меняет физико-механические свойства материала (Doi, 1990; Holmes, 19981). Семейство синтезированных и описанных к настоящему моменту ПОА включает как высококристаллические плотные полимеры, так и мягкие резиноподобные эластомеры. В принципе, большинство гетерополимерных полиоксисалканоатов являются термопластичными материалами. Однако температура плавления у различных типов ПОА варьирует от 50 до 180°C. Так, температура стеклования ПОА различного строения в зависимости от мономерного состава варьирует в широких пределах (рис. 3.24).

Выявлено, что температура плавления полимерных пленок, полученных поливом из растворов из сополимеров оксибутирата и оксигексаноата (3-ПОБ-со-3-ПОГ), снижалась от 177 до 52°C при увеличении фракции оксигексаноата от 0 до 25 мол. %; температура стеклования при этом падала от 4 до -4°C (рис. 3.24). Разрывная

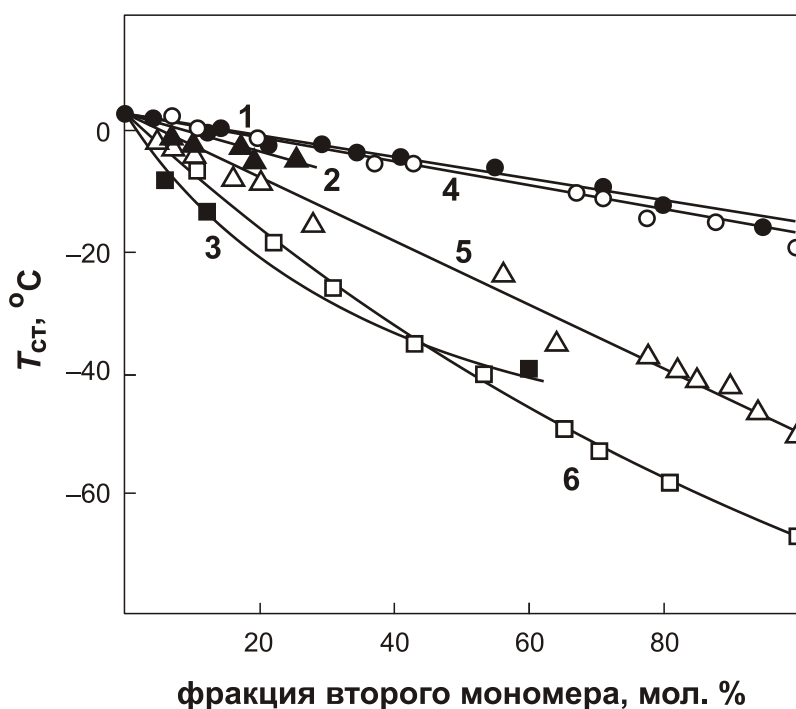


Рис. 3.24. Зависимость температуры стеклования ( $T_{ст}$ ) от фракционного состава сополимеров 3-полиоксибутирата с другими мономерами: 1 – (3ПОБ-со-3ПОВ), 2 – (3ПОБ-со-3ПОГх), (3ПОБ-со-3ПГА), 3 – (3ПОБ-со-3ПОП), 4 – (3ПОБ-со-4ПОБ), 5 – (3ПОБ-со-6ПГГ) (Sudesh et al., 2000).

прочность пленок из данного сополимера с увеличением фракции оксигексаноата от 0 до 17 мол. % падала от 43 до 20 МПа, а удлинение при разрыве возрастало от 6 до 85 % (Doi et al., 1995). Таким образом, с увеличением фракции оксигексаноата в сополимере 3-ПОБ-со-3-ПОГ пленки становятся более мягкими и эластичными.

Пленки, полученные аналогичным методом из другого типа ПОА – сополимеров оксибутирата с оксипропионатом (3-ПОБ-со-3-ПОП), имеют другие термальные характеристики (Shimamura et al., 1994; Doi et al., 1996). С увеличением доли оксипропионата в сополимере от 67 до 100 мол. % температура плавления падает от 177 до 44°C и затем возрастает до 77°C. Температура стеклования сополимера снижалась от 4 до –19°C при увеличении доли оксипропионата от 0 до 100 мол. % (рис. 3.24).

Развитие работ по биосинтезу ПОА и применение методов параметрического управления биосинтезом в сочетании с молекулярно-генетическими методами позволяет в принципе иметь разнообразные типы полимеров, включая одно-, двух-, трех- и более компонентные сополимеры оксиалкановых кислот с различными физико-химическими и физико-механическими свойствами.

#### **3.2.4. Трехкомпонентные ПОА**

Полученные гомогенные образцы трехкомпонентных ПОА, содержащих 3-оксибутират (основной мономер) и в качестве вторых мономеров: кристаллизующийся (R)-3-гидроксигексаноат (ОГх); 4-оксибутират (ОБ) и некристаллизующийся 6-оксигексаноат (ОГ), исследованы рентгенографически (Iwata and Doi, 1999; Iwata et al., 1999). Каждый тип данных сополимеров показал наличие решетчатой морфологии, сходной со строением поли-3-оксибутирата. В дифрактограммах не обнаружено принципиальных различий дифрактограмм между гомополимером оксибутирата и данными типами сополимеров. Авторы предполагают, что второй тип мономеров, входящих в состав материала, не кристаллизуется в решетку, а локализуется на ней.

Ламелярные структуры полимерных пленок, кристаллизованных из данных сополимеров при различной температуре изучены рассеивающей малоугловой рентгенографией (Abe et al., 1998). Показано, что при увеличении температуры кристаллизации от 60 до 130°C толщина ламелей поли-3-оксибутирата возрастает от 5.3 до 8.2 нм. Толщина ламелей у других сополимеров, за исключением сополимеров 3-оксибутирата и 3-оксивалерата, меньше (1.6–3.5 нм). Напротив, у сополимеров 3-оксибутирата и 3-оксивалерата данный показатель был на уровне 4.0–10.8 нм и сходен с показателем у поли-3-оксибутирата. На рис. 3.25 представлена зависимость обратной величины толщины ламелей данных сополимеров от температуры

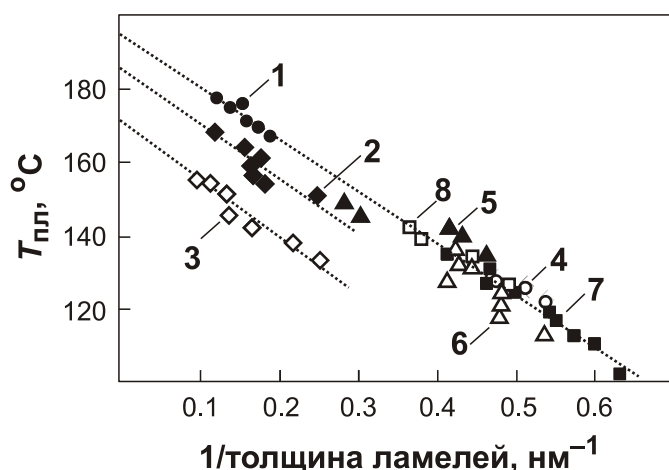


Рис. 3.25. Влияние температуры плавления различных ПОА на обратную величину толщины ламелей для полученных из расплава кристаллизованных пленок из: 1 – ЗПОБ; 2 – (ЗПОБ-со-6 мол. % ЗПОВ); 3 – (ЗПОБ-со-16 мол. % ЗПОВ); 4 – (ЗПОБ-со 8 мол. % ЗПОГ); 5 – (ЗПОБ-со-8 мол. % 4ПОБ); 6 – (ЗПОБ-со-10 мол. % 6ПОГ); 7 – (ЗПОБ-со-5 мол. % полилактида (Abe et al., 1998).

плавления. У З-ПОБ данная зависимость линейна; у сополимера оксибутирата с оксивалератом, имеющего более низкую температуру плавления, зависимость меняется в сторону снижения температуры при сходной толщине ламелей с увеличением доли оксивалерата. У другого типа материала – сополимеров оксибутирата с оксигексаноатами – область зависимости температуры плавления от обратной величины толщины ламели экстраполируется имеющейся зависимостью, полученной для гомополимера 3-оксибутирата, у которого более тонкие ламели.

У недавно идентифицированных (Madden et al., 2000) трехкомпонентных ПОА (рис.3.26), синтезированных *R.eutropha*, в зависимости от соотношения мономеров показано значительное изменение молекулярного веса. Плотность, а также температурные и механические свойства данных трехкомпонентных со-полиэфиров существенно зависят от соотношения мономеров (рис. 3.16; таблица 3.9).

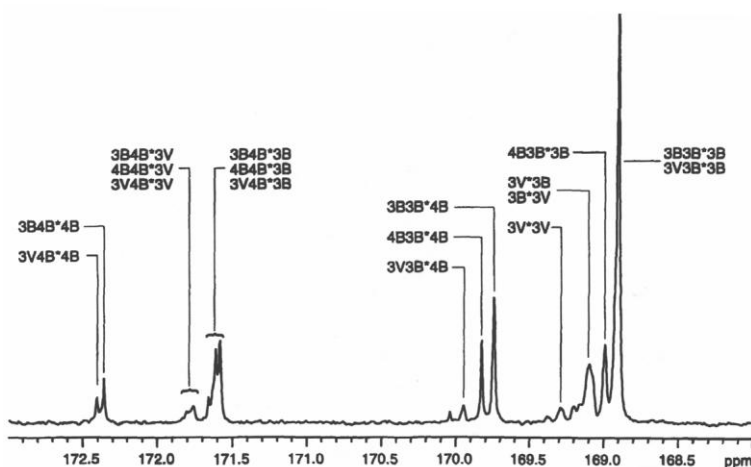


Рис 3.26.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр сополимеров (3-оксибутирата-со-3-оксивалерата-со-4-оксибутирата) (Madden et al., 2000).

Таблица 3.9

Влияние соотношения мономеров в трехкомпонентных полиоксипалканоатах на молекулярную массу полимера (Madden et al., 2000)

| Соотношение мономеров в ПОА<br>(мол. %) |               |               | $M_w$<br>( $10^{-5}$ гмоль $^{-1}$ ) | $M_w/M_n$ |
|---|---------------|---------------|--------------------------------------|-----------|
| 3-оксибутират                           | 3-оксивалерат | 4-оксибутират |                                      |           |
| 93                                      | 2             | 5             | 4.73                                 | 5.80      |
| 91                                      | 4             | 5             | 5.41                                 | 3.96      |
| 89                                      | 6             | 5             | 5.54                                 | 4.90      |
| 88                                      | 4             | 8             | 4.10                                 | 4.42      |
| 87                                      | 7             | 6             | 6.27                                 | 4.03      |
| 85                                      | 14            | 1             | 7.74                                 | 3.66      |
| 78                                      | 11            | 11            | 5.39                                 | 6.46      |
| 78                                      | 9             | 13            | 2.57                                 | 4.12      |
| 74                                      | 20            | 6             | 3.21                                 | 5.42      |

Большинство из данных трехкомпонентных сополимеров характеризуются пониженной, в сравнении с 3-ПОБ, температурой плавления и имеют увеличенное время кристаллизации (рис. 3.27).

Так, период полукристаллизации составляет у разных образцов от 4 до 16 мин по сравнению с 0.5 мин для 3-ПОБ. При содержании в полимере 80 мол. % 3-ОБ и по 10 мол. % 3-ОВ и 4-ОБ механические свойства намного превосходят бинарные сополимеры 3-оксибутирата и 3-оксивалерата.

Природные штаммы *Pseudomonas oleovorans* с использованием в качестве источника углерода различных алкановых кислот способны синтезировать среднецепочечные гетерополимерные ПОА с включением в качестве мономеров оксикислот с числом атомов углерода в цепи от 6 до 12 (Kato et al., 1996).

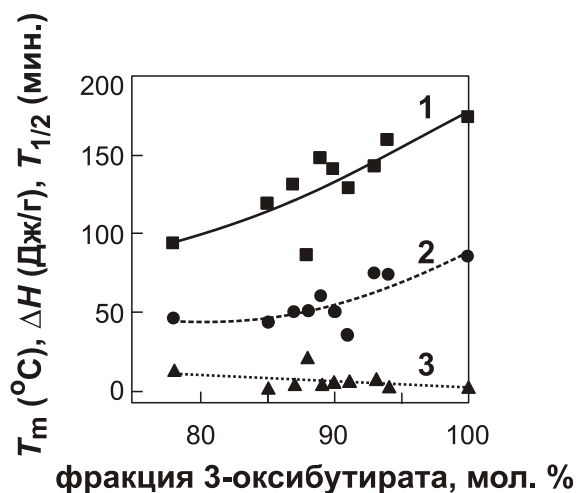


Рис. 3.27. Зависимости температуры плавления (1), энергии кристаллизации (2) и периода полукристаллизации сополимеров (3) (3ОБ-со-3ОВ-со-4ОБ) от содержания 3-оксибутирата (Madden et al., 2000).



В зависимости от фракционного состава этих среднецепочечных мономеров молекулярная масса, температура плавления и стеклования материала могут изменяться практически на порядок. Трансгенные штаммы *Pseudomonas* с клонированными генами синтеза ПОА из *Ralstonia* и других продуцентов короткоцепочечных ПОА способны синтезировать сополимеры 3-оксибутирата с разнообразными среднецепочечными оксикислотами (рис. 3.28) (Fukui et al., 1998), механические свойства которых могут быть, например, близкими низкоплотному полиэтилену (таблица 3.10).

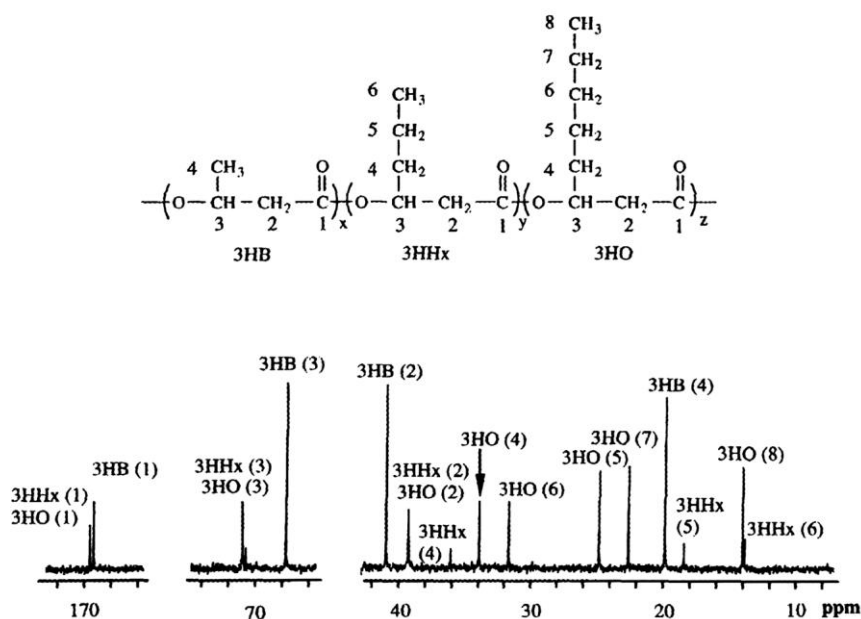


Рис. 3.28. 100 МГц <sup>13</sup>С-ЯМР спектр среднецепочечных ПОА, синтезируемых *Pseudomonas sp* 61-3 на октаноате (Fukui et al., 1998.)

Таблица 3.10  
Свойства среднецепочечных ПОА (Matsusaki et al., 2000);

| Состав                      | $T_{пл},$<br>°C | $T_{ст},$<br>°C | Модуль<br>упругости,<br>ГПа | Разрывная<br>прочность,<br>МПа | Удлинение<br>при разрыве,<br>% |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Поли(3-ОБ)                  | 180             | 4               | 3.5                         | 40                             | 5                              |
| Поли(3ОБ-со-3ОВ, 20 мол. %) | 145             | -1              | 0.8                         | 20                             | 50                             |
| Поли(3ОБ-со-3ОА, 6 мол. %)* | 133             | -8              | 0.2                         | 17                             | 680                            |
| Полипропилен                | 176             | -10             | 1.7                         | 38                             | 400                            |
| Полиэтилен низкой плотности | 130             | -30             | 0.2                         | 10                             | 620                            |

\* фракция сополимеров оксикислот (6 мол. %) включает: 3-оксидеканоат (3 мол. %); 3-гидроксигексаноат (3 мол. %); 3-гидроксиоктаноат (< 1 мол. %) и 3-гидроксидодеканоат (< 1 мол. %).

Разнообразные среднецепочечные ПОА получены при выращивании бактерий *Ps. putida* PGA1 на омыленных производных пальмового масла и жирных кислотах (Tan et al., 1997). В зависимости от состава жирных кислот используемого субстрата спектр мономеров в ПОА может быть представлен оксикислотами с длиной углеродной цепи от C<sub>6</sub> до C<sub>14</sub> (рис. 3.29).

В таблице 3.11 дан состав и соотношение мономерных фракций в ПОА, синтезируемых *P. putida* PGA1 на разных углеродных субстратах.

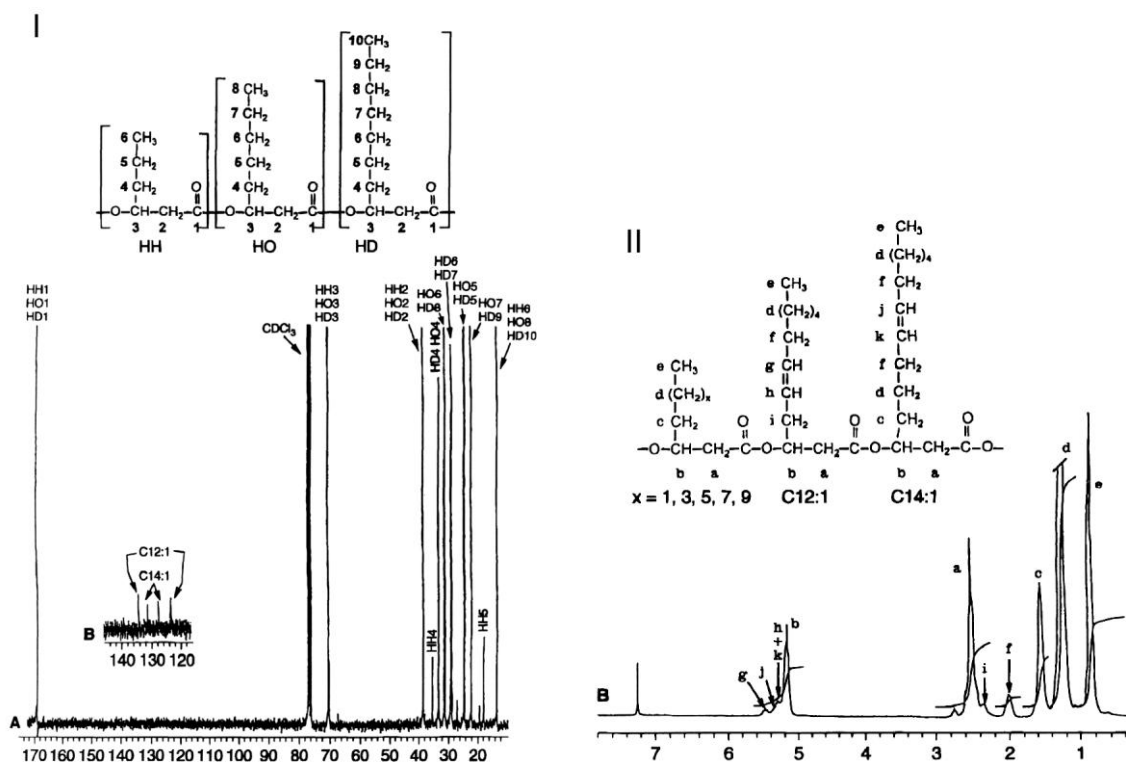


Рис. 3.29. ЯМР спектры ПОА, синтезированных *P.putida* (Tan et al., 1997).

I – 67.8 МГц <sup>13</sup>С ЯМР спектры сополимеров (ПОГ-со-ПОО-со-ПОД) в дейтерохлороформе при 27°С (А – олеиновая или меристиновая кислоты и В – омыленные производные пальмового масла) (даны только сигналы углеродных атомов, имеющих двойные связи в ненасыщенных мономерах);

II – 270 МГц <sup>1</sup>Н ЯМР спектр ПОА, полученного при росте штамма на омыленных производных пальмового масла

Таблица 3.11

Состав многокомпонентных среднецепочечных ПОА, синтезируемых *P.putida* PGA1 (Tan et al., 1997)

| Углеродный субстрат       | Соотношение мономеров в ПОА (мол. %) |                |                 |                   |                   |                   |                   |
|---------------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                           | C <sub>6</sub>                       | C <sub>8</sub> | C <sub>10</sub> | C <sub>12:0</sub> | C <sub>12:1</sub> | C <sub>14:0</sub> | C <sub>14:1</sub> |
| Омыленное пальмовое масло | 8.7                                  | 82.9           | 4.5             | 1.4               | 0.7               | 1.3               | 0.6               |
| Лауриновая кислота        | 7.2                                  | 84.7           | 4.6             | 4.0               | 0                 | 0                 | 0                 |
| Миристиновая кислота      | 7.0                                  | 82.6           | 4.5             | 2.7               | 0                 | 3.5               | 0                 |
| Олеиновая кислота         | 10.4                                 | 83.2           | 3.4             | 0.9               | 0.2               | 2.0               | 0.5               |

Таблица 3.12

**Свойства ПОА, синтезируемых *P.putida* PGA1  
на разных углеродных субстратах (Tan et al., 1997)**

| Углеродный субстрат       | $M_v$ (Da) | $T_{ст}$ (°C) | $T_{пл}$ (°C) | Энергия кристаллизации (Дж/г) |
|---------------------------|------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Омыленное пальмовое масло | 124 000    | -45           |               |                               |
| Лауриновая кислота        | 132 000    | -41           | 53            | 14.6                          |
| Миристиновая кислота      | 174 000    | -38           | 54            | 11.3                          |
| Олеиновая кислота         | 142 000    | -46           |               |                               |

У данных образцов ПОА проанализированы температурные характеристики и определен молекулярный вес. Существенных различий в данных показателях между образцами, однако, обнаружено не было (таблица 3.12). Следует отметить, что по содержанию в ПОА основных фракций ( $C_6$ ,  $C_8$  и  $C_{10}$ ) образцы были довольно близкими; а остальные компоненты ( $C_{12}$ – $C_{14}$ ), присутствующие в минорных количествах, возможно, не оказывают из-за этого существенного влияния на измеренные параметры материала.

Охарактеризована серия трехкомпонентных сополимеров оксибутирата-оксивалерата-оксигексаноата, синтезированных бактерией *Ralstonia eutropha* B5786, с применением хроматомасс-спектрометрии, рентгена, сканирующей калориметрии и вискозиметрии.

На рис. 3.30 представлена хроматограмма и масс-спектры данных трехкомпонентных ПОА. Рентгеновские спектры трехкомпонентных ПОА, синтезированных *R. eutropha*, содержащих в качестве основного мономера оксибутират, а также включения оксивалерата и оксигексаноата, представлены на рис. 3.31.

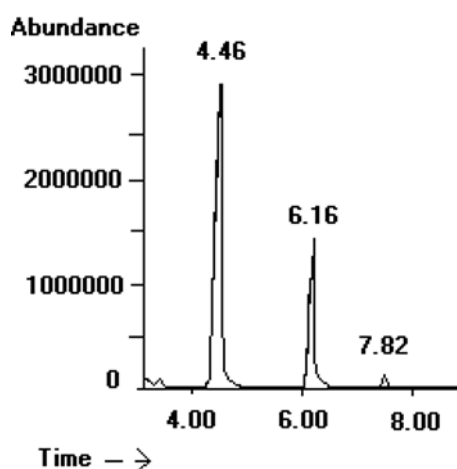


Рис. 3.30. Хроматограмма, характеризующая химический состав трехкомпонентного ПОА, синтезированного *Ralstonia eutropha* B 5786 (ПОБ-со-ПОВ-со-ПОГ) (пики метиловых эфиров  $\beta$ -оксибутирата (4.46),  $\beta$ -оксивалерата (6.16) и  $\beta$ -оксигексаноата (7.82) (Volova et al., 2002).

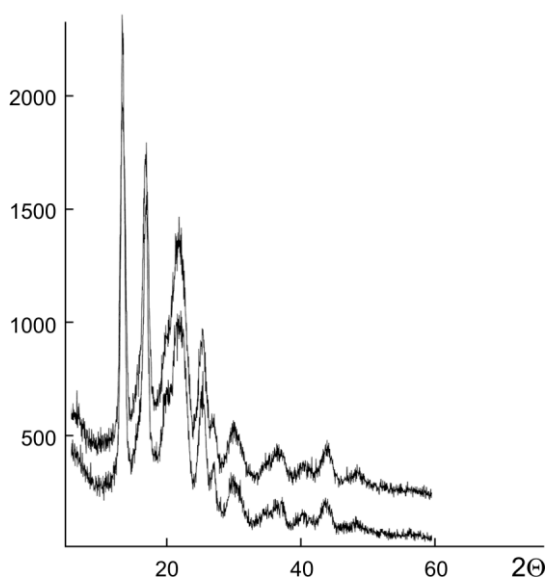


Рис. 3.31. Рентгеновские спектры ПОБ-со-ПОВ-со-ПОГ сополимеров с соотношением мономеров как: 98.0:0.7:1.3 и 96.4:1.3:2.6 мол. %. Степень кристалличности образцов, соответственно, 72 и 73 % (Volova et al., 2002).

В данных образцах, аналогично полиоксибутирату, доминирующей является кристаллическая фаза. Степень кристалличности полученной серии трехкомпонентных ПОА составляет свыше 70 %.

Существенных различий температурных свойств у данных сополимеров по сравнению с гомополимером оксибутирата не выявлено (таблица 3.13). Молекулярный вес образцов имел значения в диапазоне от 90 000 до 716 000 Da.

Таблица 3.13

Свойства коротко- и среднецепочечных полимеров, синтезированных *R. eutropha* B5786 (Volova et al., 2002)

| Углеродный субстрат                                      | Состав ПОА, мол. % : |                |                | M в (Da) | T <sub>пл.</sub> (°C) | Кристалличность, C <sub>x</sub> (%) |
|--|----------------------|----------------|----------------|----------|-----------------------|-------------------------------------|
|  | C <sub>4</sub>       | C <sub>5</sub> | C <sub>6</sub> |          |                       |                                     |
| CO <sub>2</sub> + C <sub>6</sub>                         | 88.7                 | сл             | 1.3            | 90 000   | 186                   | 81                                  |
| фруктоза+ C <sub>5</sub> +C <sub>6</sub>                 | 86.0                 | 12.8           | 1.2            | 290 000  | 158                   | 70                                  |
| фруктоза+CO <sub>2</sub> +C <sub>5</sub> +C <sub>6</sub> | 90.3                 | 7.8            | 1.9            | 450 000  | 179                   | 69                                  |
| CO <sub>2</sub> +C <sub>7</sub>                          | 80.8                 | 16.9           | сл             | 600 000  | 182                   | 67                                  |
| фруктоза+CO <sub>2</sub> +C <sub>5</sub> +C <sub>7</sub> | 90.8                 | 9.2            | –              | 226 400  | 176                   | 69                                  |
| ацетат+C <sub>7</sub>                                    | 68.0                 | 0.8            | сл.            | 716 000  | 183                   | 80                                  |
| CO <sub>2</sub> +C <sub>8</sub>                          | 97.1                 | 0.1            | 2.8            | 240 000  | 180                   | 70                                  |
| фруктоза+CO <sub>2</sub> +C <sub>8</sub>                 | 96.1                 | 1.3            | 2.6            | 612 000  | 172                   | 73                                  |
| CO <sub>2</sub> + C <sub>9</sub>                         | 97.6                 | 1.0            | 1.4            | 300 000  | 172                   | 72                                  |
| фруктоза + C <sub>5</sub> +C <sub>9</sub>                | 89.0                 | 9.9            | 0.4            | 460 000  | 174                   | 69                                  |
| фруктоза+C <sub>9</sub>                                  | 96.0                 | 3.6            | 0.4            | 320 000  | 180                   | 81                                  |
| фруктоза + C <sub>10</sub>                               | 98.0                 | 0.7            | 1.3            | 103 000  | 178                   | 72                                  |

Однако, это только первые исследования вариантов трехкомпонентных полиоксиалканоатов, и дальнейшая оптимизация ферментационного процесса, возможно, позволит в будущем иметь образцы полимеров с большей вариабельностью состава и большими включениями оксивалерата и оксигексаноата. Более того, в настоящее время, очень мало данных о влиянии оксигексаноата на физико-механические свойства полимеров, поэтому говорить о перспективности данных гетерополимерных ПОА для переработки в специальные изделия пока рано.

Таким образом, уже сейчас видно, что биотехнологический потенциал штаммов-продуцентов ПОА, позволяет получать разнообразные по составу полимеры, обладающие широким спектром физико-химических свойств.

### **3.3. Диэлектрическая проницаемость ПОА**

Свойства ПОБ и других ПОА во многом определяются структурой мономерного звена, молекулярной массой, степенью гибкости полимерной цепи в макроскопическом масштабе, а также мелкомасштабной конформационной внутримолекулярной подвижностью (Anderson and Dawes, 1990; Sudesh et al., 2000 и др.). Внутримолекулярные ориентационные движения цепных макромолекул в электрическом поле могут возникать вследствие наличия в мономерном звене постоянного или индуцированного дипольного момента; при этом изменение ориентации участков макромолекулы имеет кооперативный характер, при котором движение каждого элемента цепи влияет на смещение соседних элементов. Изучение особенностей молекулярных движений представляет важную физическую задачу, решению которой уделяется большое внимание (Базаров и Геворкян, 1992). Однако для выявления механизма внутримолекулярной подвижности требуется проведение комплексных исследований, включая частотные, температурные, электрополевые зависимости диэлектрических констант твердых материалов, а также изучения разбавленных растворов с целью определения дипольного момента и молекулярной поляризуемости изолированных невзаимодействующих молекул.

#### **3.3.1. Диэлектрическая проницаемость твердотельных ПОА**

Всестороннее изучение диэлектрических характеристик полиоксиалканоатов только начинается. В первых работах этого направления исследований (Ando and Fukada., 1984. Fukada and Ando., 1986) было отмечено, что присутствие несимметричного углеродного атома, связанного с полярной группой кислорода, является характерным для большинства биологических молекул, поэтому такие биопо-

лимеры, как ПОБ и сополимеры ПОБ-со-ПОВ должны обладать пьезоэлектрическими свойствами и показывать высокую оптическую активность. Вблизи температуры перехода из стеклообразного в подвижное аморфное состояние для механически деформированных (растянутых) пленок ПОБ и сополимеров ПОБ-со-ПОВ, действительно, экспериментально были зафиксированы диэлектрические поляризационные процессы, которые могли быть приписаны пьезоэлектрическим движениям спиралевидных конформаций полимерных цепей с временами релаксации  $\tau = 1.3 \times 10^{-2}$  с (Ando and Fukada, 1984).

В образцах ПОБ, специально не подвергнутых механическим деформациям, электрические характеристики и диэлектрические константы недавно были определены в радиочастотном диапазоне (Pratt and Smith, 1999). А в работе (Ashraf et al., 1999) диэлектрическая проницаемость использована для изучения процесса кристаллизации ПОБ. Авторами проведены исследования, отражающие температурные точки начала и конца кристаллизации в твердофазных аморфных образцах ПОБ и сополимерах ПОБ-со-ПОВ в диапазоне 1–100 кГц. На основании полученных диэлектрических спектров при температурном сканировании со скоростью 1 С/мин. установлено, что для ПОБ кристаллизационный процесс начинается при  $T_c = 30^\circ\text{C}$ . Показано, что отличия в температурно-частотных диэлектрических спектрах ПОБ-со-ПОВ в основном контролируются скоростью нагрева и долей кристаллизации. Измерения температур начала и конца кристаллизации при более медленных скоростях нагрева показывают, что температура начала кристаллизации  $T_c$  уменьшается и в пределе нулевых скоростей можно говорить о «холодной» кристаллизации  $T_{\text{onset}}$ . Высокое содержание оксивалерата при скорости кристаллизации 1 С/мин. заметно увеличивает  $T_c$ , однако,  $T_{\text{onset}}$  остается неизменной. В этой же работе предложено поведение диэлектрической константы в зависимости от кристаллизационного времени выразить следующей эмпирической формулой:

$$\epsilon(t) = (\epsilon_1 - \epsilon_f) / (\epsilon_1 - \epsilon_f),$$

где  $\epsilon_1$  – диэлектрическая константа при начале кристаллизации,  $\epsilon_f$  – конечное значение.

Поведение  $\epsilon(t)$  может быть также описано уравнением Аврами:

$$\epsilon_n(t) = 1 - \exp(-kt^n),$$

где  $k$ ,  $n$  – скорость кристаллизации и механистический параметр.

С точки зрения молекулярной подвижности увеличение  $T_c$  с ростом содержания валерата связано с тем, что внедрение звеньев ПОВ в цепь ПОБ ведет к увеличению молекулярной подвижности целой цепи из-за увеличения длины боковых групп. Ввиду этого, с одной стороны будет увеличиваться вероятность зарождения первичных центров кристаллизации, а с другой стороны сектора ПОВ

будут приводить к структурным дефектам, что уменьшает не только скорость, но и степень кристаллизации.

В работе (Pratt, Smit, 1999) температурно-частотные зависимости действительной проницаемости и тангенса угла диэлектрических потерь для сополимеров ПОБ-со-ПОВ приведены в виде контурных карт, на которых отчетливо просматриваются как минимум четыре дисперсионные области в диапазоне частот от 0.1 до 3 МГц и при температурах от  $-175$  до  $145^{\circ}\text{C}$ . В области низких температур и частот 0.01–0.1 Гц диэлектрические потери связываются с движением локальной моды углерода, включая кооперативное движение метиловых и эфирных групп ( $\beta$ -релаксация). Энергия активации этого процесса составляет величину  $62 \text{ кДж мол}^{-1}$  для ПОБ-со-ПОВ и  $58 \text{ кДж мол}^{-1}$  для ПОВ.

Наиболее яркий интенсивный пик потерь, наблюдаемый при  $-5 < T < 60^{\circ}\text{C}$  и при 1–3 МГц, ассоциирован с переходом из стеклообразного в подвижное аморфное состояние ( $\alpha$ -релаксация). Характерной особенностью этой  $\alpha$ -области является ее смещение в сторону низких температур и одновременно ее уменьшение с ростом содержания валерата.

В области  $\alpha$ -релаксации видна также явная асимметрия, которой могут быть присвоены релаксационные процессы  $\alpha$  и  $\alpha'$  от аморфных и кристаллических областей. Выявленная асимметрия пика со стороны высоких  $T$  и высоких частот может быть связана с существованием специфической жестко-аморфной интерфазы как границы между кристаллической и мобильной аморфной областями. Эти интерфазные области имеют более заторможенные диполи, чем в нормальной аморфной фазе и более подвижные, чем диполи в кристаллической области. Область  $\alpha$ -релаксации может быть ассоциирована с броуновским движением молекулярных цепей с широким распределением времен релаксаций в области перехода стекло – аморфное состояние.

Острый, но относительно слабый пик потерь, идентифицированный как третья область дисперсии, расположен около  $-160^{\circ}\text{C}$  при 0.1–0.01 Гц. Его расположение типично и для других полимеров не биологического происхождения и связывается обычно с присутствием малых стабилизирующих фосфитов. Четвертая область дисперсии просматривается при максимально высоких температурах и частотах, и она может быть приписана поляризационным процессам за счет  $dc$ -проводимости (область Максвелл-Вагнер-Силлара MWS) на поверхностях между аморфной и кристаллической фазами.

Таким образом, из анализа литературных данных видно, что диэлектрические константы ПОБ и сополимеров ПОБ-со-ПОВ определены к настоящему времени только в квазистатической области на частоте 10 Гц (Fukada et al., 1986). Исследования диэлектрических

характеристик полимеров в более высокочастотном диапазоне не известны. Подобные исследования, особенно в дециметровом диапазоне волн, вследствие малой величины диэлектрической проницаемости ПОБ затруднены и требуют специальной техники.

Под руководством профессора Б. А. Беляева в Институте физики СО РАН на образцах, синтезированных и очищенных в Институте биофизики СО РАН, выполнено исследование диэлектрической проницаемости полиоксибутирата (Беляев с соавт., 2000а, б) и сополимеров оксибутирата с оксивалератом (Беляев с соавт., 2002), включая СВЧ дециметровый диапазон, в зависимости от частоты электрического поля и температуры. Измерения диэлектрической проницаемости проводили на материалах в различном фазовом состоянии: в виде сухого вещества, заполняющего измерительную ячейку после высушивания раствора ПОБ, на растворах ПОБ (1/5 вес. %) в хлороформе.

Для исследований диэлектрической проницаемости использовали высокочувствительные резонансные датчики нового типа, сконструированные в Институте физики им. Л. В. Киренского СО РАН на основе нерегулярных микрополосковых СВЧ-резонаторов (Беляев с соавт., 1995; 1997). Рабочий объем измерительной ячейки  $3.5 \times 3.5 \times 0.1 \text{ мм}^3$ . Для температурных исследований применялся датчик, работающий на частоте 900 МГц, с чувствительностью не ниже  $10^{-2} - 10^{-3}$  при  $2 < \varepsilon < 6$ . Чувствительность датчика определяли по сдвигу резонансной частоты микрополоскового резонатора при помещении в зазор измерительной ячейки калибровочного вещества (полиэтилен, бензол, октан и др). Дисперсионные зависимости диэлектрической проницаемости полиоксибутирата исследованы в диапазоне от 1 до 1000 МГц с помощью Q-метра, а также перестраиваемых кольцевых микрополосковых резонаторов (Волохина с соавт., 1988). Измерительный резонатор с образцом помещался в термостат с регулируемой температурой в диапазоне 20–70°C (точность стабилизации 0.1°C). Измерения резонансных частот датчика проводили с помощью стандартных цифровых высокочастотных панорам, затем вычисляли по калибровочным данным зависимости действительной компоненты диэлектрической проницаемости образцов ПОБ от температуры.

Известно, что в переменном электрическом поле в молекулах полимеров индуцируется дипольный момент, и отдельные сегменты молекул и мономерные звенья испытывают сложные поступательные или вращательные движения. Движения цепных макромолекул определяются специфическими механизмами внутримолекулярной гибкости и могут быть описаны с помощью, так называемых, секторов Куна (Эме, 1967). Сектор Куна характеризует масштаб изгиба фрагмента цепи ( $\lambda$ ), причем отношение  $\lambda = h/d \gg 1$ , ( $h$  – длина изги-



ба и  $d$  – толщина цепи). Учитывая большую эффективную массу персистентного сектора гибкости, обычно  $\lambda \sim 1000\text{--}2000$ , можно ожидать, что релаксационный участок дисперсии в полимерах типа ПОБ будет находиться при достаточно низких частотах (радиочастотах). Действительно, проведенные измерения диэлектрических спектров твердых образцов полиоксибутирата в диапазоне от 1 МГц до 1 ГГц не выявили каких либо дисперсионных областей (рис 3.32). Для сопоставления приведен диэлектрический спектр для жидкого кристалла 5CB, в котором область дисперсии начинается с частот 300–500 МГц при отношении длины молекулы к толщине  $\lambda = 1.5\text{--}2.0$ . Как видно из рисунка 3.32, диэлектрическая проницаемость ПОБ в твердом виде составляет величину  $\varepsilon' = 2.19\text{--}2.23$  при  $T = 25^\circ\text{C}$ . Такие малые значения характерны для молекул, не имеющих собственного дипольного момента, поэтому диэлектрическую проницаемость можно связывать с индуцированной поляризацией.

Далее было обнаружено, что изменение температуры и фазового состояния неадекватно влияет на величину  $\varepsilon'$ . Это требует учета более сложных температурно-зависимых механизмов поляризации с учетом конформаций молекулярного звена, гибкости полимерных цепочек, которые проявляются даже в дециметровой СВЧ-области. Типичная температурная зависимость диэлектрической проницаемости  $\varepsilon'(T)$  приведена на рис. 3.33 для двух образцов ПОБ, показывающих предельные значения. Точность определения диэлектрической постоянной ( $\varepsilon' = \pm 0.008$ ).

Для большинства других образцов полимера, полученных методом налива из растворов и высушивания, температурные зависимости располагались между кривыми 1 и 2, однако, значение темпера-

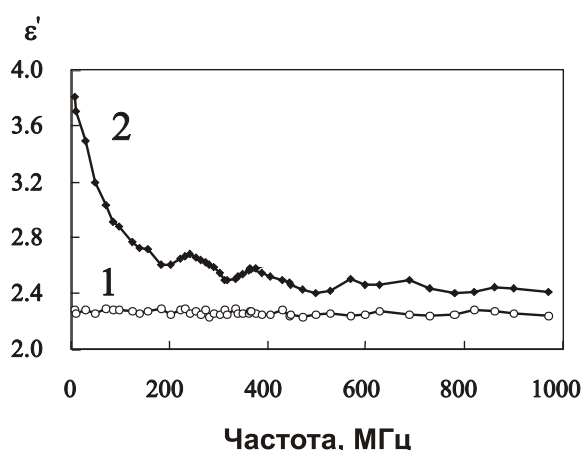


Рис. 3.32. Частотная зависимость диэлектрической проницаемости для ПОБ (1) и жидкого кристалла 5CB (*n*-Pentil-*p*-*n*-Cyanobiphenyl) (2) (Беляев с соавт., 2000а).

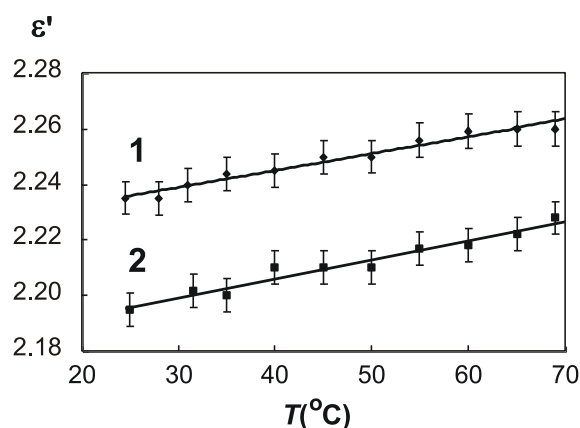


Рис. 3.33. Температурная зависимость ПОБ в твердом состоянии для двух образцов. (Беляев с соавт., 2000а).

турного приращения диэлектрической проницаемости во всех случаях составило  $\Delta\varepsilon'(E)/\Delta T = 0.00054$ . Полученная зависимость  $\varepsilon'(T)$  в пределах точности измерений линейна.

### 3.3.2. Диэлектрические характеристики растворов ПОА

Полиоксибутират растворим в хлороформе, этилацетате, ледяной уксусной кислоте и некоторых других неполярных растворителях, и данные растворы обладают поляризационными свойствами (Anderson and Dawes, 1990). Для выявления особенностей поляризации растворов и определения величины дипольных моментов молекул измерены температурные зависимости растворов ПОБ в хлороформе (Беляев с соавт., 2000б). В ходе проведения измерений датчик модифицировали. Для этого вокруг измерительных пластин приклеивали стеклянную трубочку, служащую стаканом, которую сверху закрывали пленкой фторопласта. Раствор заливали в стакан, систему герметизировали и после стабилизации температуры в каждой точке проводили измерения. Параллельно проведены измерения температурной зависимости  $\varepsilon'$  для чистого хлороформа. Вычисление разницы  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{раств}} - \varepsilon_{\text{хлор}}$  позволило выявить вклад полиоксибутирата в поляризуемость раствора. По результатам построена зависимость  $\Delta\varepsilon'(T)$  ПОБ для двух образцов с предельными значениями величины (рис. 3.34). Как показано на рисунке, для растворов ПОБ с ростом температуры наблюдается неустойчивое волнообразное изменение  $\Delta\varepsilon'(T)$ .

Химическая формула полиоксибутирата  $C_4H_6O_2$  может быть представлена в виде структурной молекулярной ячейки отдельного звена полимерной цепи как  $[-O-CH(CH_3)-CH_2-CO-]$ . Основной вклад в поляризацию молекулярного звена, могут вносить группы  $CH$ ,  $CH_2$ ,  $CH_3$ , индуцированный дипольный момент которых формируется с учетом, как минимум, двух возможных изомерных конформаций (Фалалеев с соавт., 1994). Группа  $CO$  расположена несимметрично к оси

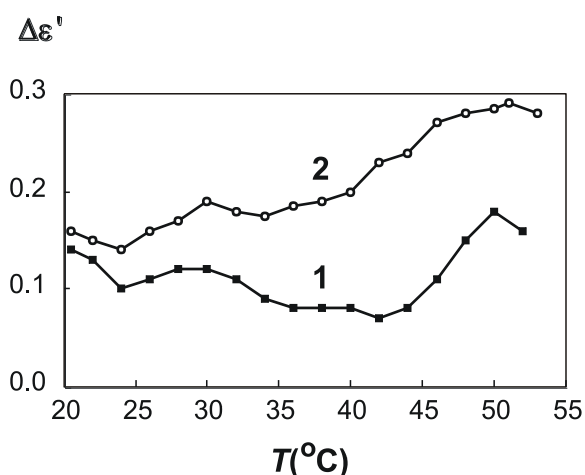


Рис. 3.34. Температурная зависимость  $\Delta\varepsilon'$  для двух образцов ПОБ в хлороформе (Беляев с соавт., 2000б).

звена, и тот факт, что диэлектрическая проницаемость полимера мала  $\varepsilon' \approx 2.19-2.23$ , позволяет говорить о взаимной поляризационной компенсации этих групп. Следует учесть, однако, что в ПОБ даже в твердом состоянии при  $T > 123$  К наблюдается значительная подвижность как крупномасштабных фрагментов цепи полимера, так и изгибы между отдельными молекулярными звеньями. Такая высокая подвижность является следствием наличия в ПОБ значительного количества аморфной фазы, около 35–40 % (Петраковская с соавт., 1995). С увеличением температуры интенсивность молекулярных движений возрастает, поэтому гибкость может быть положена в основу объяснения эффекта температурного увеличения диэлектрической проницаемости полиоксибутирата.

В литературе обсуждаются различные модели молекулярной гибкости: модель свободно-сочлененной, поворотной-изомерной цепи или модель персистентной гибкости (Эме, 1967). Для описания полученных температурных зависимостей можно, например, воспользоваться хорошо известной решеточной моделью Флори (Базаров и Геворкян, 1992; Волохина с соавт., 1988), в которой гибкая полимерная цепь представляется случайным блужданием изломов на пространственной решетке. Гибкость цепи определяется долей  $f_0$  шагов, отвечающих повороту. Этот параметр  $f_0$  связан с дополнительной энергией, возникающей при изломе соотношением:

$$f_0 = \frac{(z-2)\exp(-E/T)}{1+(z-2)\exp(-E/T)},$$

где  $z$  – координационное число решетки ( $z = 6$  для кубической решетки),  $E$  – энергия излома. Когда гибкости нет  $\varepsilon = 0$  и  $f_0 = 0.8$ .

Если поведение диэлектрической проницаемости обусловлено гибкостью, то взаимосвязь  $\varepsilon'$  и параметра  $f_0$  должны, в первую очередь, отражаться в совпадении их температурных зависимостей в измеренном температурном интервале от 20 до 70°C.

$$\delta\varepsilon/\delta T = \delta f_0/\delta T.$$

Из данных, приведенных на рисунке, можно определить, что величина  $\delta\varepsilon/\delta T$  равна для ПОБ  $(5.4-7)\times 10^{-4}$  град<sup>-1</sup>. Для этих значений из выражения (1) с учетом (2) вычислена энергия гибкости, которая составила  $E = 348-392$  К или  $(4.54-4.8)\times 10^{-14}$  эрг. Полученные величины энергии изгиба полиоксибутирата близки соответствующим энергиям для низкомолекулярных веществ типа жидких кристаллов с гибкими алкильными С–Н группами  $E = 250$ К (Базаров и Геворкян, 1992).

При исследовании раствора ПОБ в хлороформе наблюдается достаточно сильное увеличение диэлектрической проницаемости раствора  $\varepsilon_{\text{раств}}$  по сравнению с растворителем  $\varepsilon_{\text{хлороф}}$ . Величина  $\delta\varepsilon \cdot C = \varepsilon_{\text{раств}} - \varepsilon_{\text{хлороф}}$  носит название диэлектрического инкремента

раствора с концентрацией ( $c$ ), и для ПОБ он является положительным. В многочисленных работах из измерений инкремента делались попытки рассчитать дипольные моменты. Наиболее простое соотношение для сильнополярных растворителей было получено Кирквудом и имеет вид: (Веденов, 1984):

$$\rho_m \rho_i \cos \theta = 10.9 \delta \epsilon,$$

где  $\theta$  – угол между направлением дипольного момента отдельной молекулы полимера  $\rho_m$  и направлением индуцированного момента  $\rho_i$ . Для среднего момента  $\langle p \rangle$ , который является векторной суммой  $\rho_m$  и  $\rho_i$ , это уравнение принимает вид:  $\langle p \rangle^2 = 10.9 \delta \epsilon$ . При  $T = 20^\circ\text{C}$  из рис. 3.34 следует, что  $\delta \epsilon \approx 0,15$ , тогда получим  $\langle p \rangle = 1,27$ . Для хлороформа  $\rho_i = 1.15 \text{ D}$ , и дипольный момент молекулы полимера  $\rho_m = 0.12 \text{ D}$  (D – дебай).

Полученное значение  $\rho_m$  следует рассматривать как оценочное. В растворах полимеров для диэлектрической поляризуемости большое значение имеет вопрос о конфигурационном состоянии отдельной молекулы. Многочисленные эксперименты для различных полимеров показывают, что в зависимости от температуры, состава растворителя, его ионной силы конфигурация молекул полимера может сильно меняться от чрезвычайно разбухшего «клубка» свернутых цепей молекул до компактной глобулы (Волохина с соавт., 1988). При изменении температуры в растворе полимера в хлороформе возможно происходят сложные изменения состояния молекул и именно это отражается на волнообразном поведении диэлектрического инкремента.

Таким образом, установлено, что дипольный момент отдельного сектора цепи весьма мал ( $\rho_m \approx 0.12 \text{ D}$ ), а гибкость полимерной цепи в аморфной фазе может быть ответственна за наблюдаемую температурную зависимость как действительной компоненты СВЧ-диэлектрической проницаемости, так и мнимой, определяющей диэлектрические потери. Этот вывод позволяет целенаправленно совершенствовать свойства ПОБ, который может найти широкое применение в СВЧ-технике.

Далее с целью выявления взаимосвязи между диэлектрической проницаемостью растворов ПОА и микроскопическими характеристиками (динамическая вязкость, средневесовой молекулярный вес, дипольный момент звена) были изучены диэлектрические характеристики растворов сополимеров оксибутирата с оксивалератом в сравнении с гомополимером оксимасляной кислоты (Беляев с соавт., 2002). Концентрация оксивалерата в сополимерных образцах составила 7, 18, 27, 41 и 62 мол. %.

Диэлектрические измерения показали, что в широком интервале частот ( $10^2$ – $10^5$  Гц) действительные компоненты диэлектрического ин-

кремента растворов серии образцов ПОБ, полученных в различных технологических условиях, являются положительными и попадают в интервал значений  $\gamma' \approx 1 \div 20$  при  $T = 20^\circ\text{C}$ . Тангенс угла диэлектрических потерь, измеренный на частоте  $f = 10^3$  Гц, для всех исследованных образцов гомополимеров был приблизительно одинаковым  $\text{tg}(\delta_s) \approx 5 \times 10^{-1}$ , а с ростом частоты он уменьшался до значений  $\text{tg}(\delta_s) \approx 2 \times 10^{-3}$ . Измерения на образцах ПОБ-со-ПОВ показали, что диэлектрический инкремент растворов достигает своих наибольших значений  $\gamma' \approx 20$  при концентрациях оксивалерата свыше 27 мол. %.

Результаты измерений  $\gamma'$  и  $\bar{M}_w$  растворов серии образцов исследуемых сополимеров с различной концентрацией валерата ( $N$ ) представлены на рис. 3.35.

Обращает на себя внимание тот факт, что между измеренными средневесовыми молекулярными весами  $\bar{M}_w$  и величиной  $\gamma'$  видна связь, заключающаяся в том, что при увеличении  $\bar{M}_w$  диэлектрический инкремент  $\gamma'$  падает и наоборот. Однако необходимо отметить, что однозначно связывать такое поведение диэлектрического инкремента  $\gamma'$  с реальным изменением средневесового молекулярного веса макромолекул вряд ли правильно, так как полидисперсность, равная отношению средневесового к среднечисловому молекулярному весу  $\bar{M}_w / \bar{M}_n$ , в этих материалах может достигать, как было отмечено выше, достаточно больших величин (2.5–3.0). По-видимому, наблюдаемая корреляция действительной части диэлектрического инкремента как в гомо, так и в сополимерах, возможно обусловлена не только изменением  $\bar{M}_w$ , но и совокупностью других причин, например, достаточно сильным изменением динамической вязкости растворов (0.1–1.5 Пуаз), а также изменением внутримолекулярной гибкости (подвижности) макроцепей при введении валерата, особенностями структурных форм макромолекул в растворе (линейные, клубкообразные, спиралевидные и др).

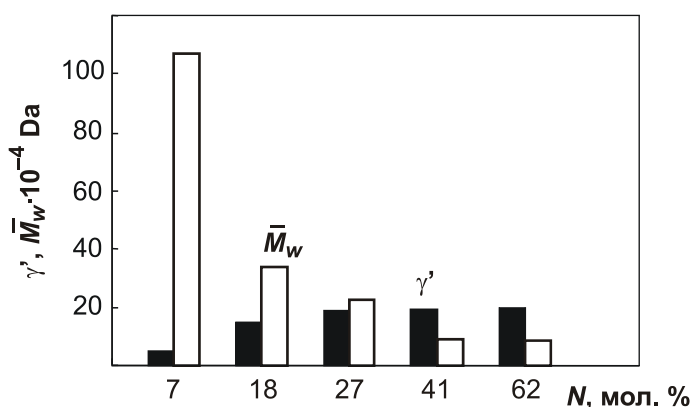


Рис. 3.35. Значения средней молекулярной массы  $M_w$  (светлые столбцы) и действительной компоненты диэлектрического инкремента  $\gamma'$  (темные столбцы) сополимеров ПОБ-со-ПОВ с различной концентрацией оксивалерата (Беляев с соавт., 2002).

В растворах сополимеров на частоте  $f = 1$  кГц при  $T = 20^\circ\text{C}$  величина диэлектрических потерь практически для всех концентраций валерата находится в пределах  $\text{tg}(\delta_s) \approx (1-3)$ . Как показал эксперимент, действительная часть диэлектрического инкремента растворов ПОБ-со-ПОВ  $\gamma'(f)$  оказывается частотно независимой в диапазоне  $10^2-10^5$  Гц, а диэлектрические потери с увеличением частоты уменьшаются по гиперболическому закону от  $\text{tg}(\delta_s) \approx (1-3)$  до  $\text{tg}(\delta_s) \approx 10^{-3}$  на частотах  $10^5$  Гц. Как показали численные оценки, низкочастотные диэлектрические потери в исследуемых растворах биополимеров обусловлены в основном их проводимостью  $G_s = (4-6) \cdot 10^{-7}$  S (Сименс).

Достаточно сложные зависимости обнаружены при температурных и концентрационных исследованиях проводимости растворов сополимеров. Результаты измерений  $G_s(T)$  на частоте  $f = 10^3$  Гц в интервале температур  $(-50^\circ\text{C} \div +50^\circ\text{C})$  представлены на рис. 3.36 в виде «объемных графиков».

Характер зависимостей  $G_s(T)$  для всех образцов немонотонный. Следует обратить внимание на то, что в области положительных температур с ростом концентрации валерата проводимость растворов увеличивается. Для образцов с 7 и 18 мол. % ПОВ, обладающих наименьшими диэлектрическими инкрементами  $\gamma'$  и соответственно наибольшей средней молекулярной массой, с ростом температуры высокочастотная проводимость слабо уменьшается. Минимальное высокотемпературное изменение проводимости наблюдается для образца, содержащего 27 мол. % ПОВ.

В отличие от проводимости, диэлектрические инкременты  $\gamma'$  у всех растворов сополимеров с уменьшением температуры от  $+50^\circ\text{C}$  до  $-64^\circ\text{C}$  имеют тенденцию лишь к небольшому монотонному возрастанию (в 1.2–1.3 раза). Дальнейшее охлаждение растворов приводит к фазовому переходу раствора из жидкого состояния в твердо-замороженное. Температура замерзания раствора практически совпадает с температурой замерзания хлороформа ( $-64^\circ\text{C}$ ). На рис. 3.37, в качестве примера, представлены температурные зависимости действительной компоненты диэлектрической проницаемости  $\epsilon'_s$  и тангенса

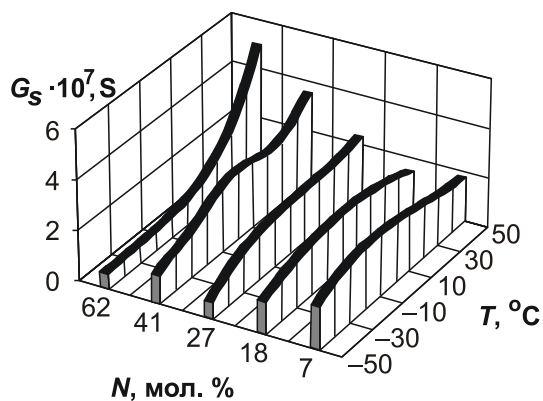


Рис. 3.36. Температурные зависимости проводимости образцов ПОБ-со-ПОВ при различных концентрациях оксивалерата (Беляев с соавт., 2002).

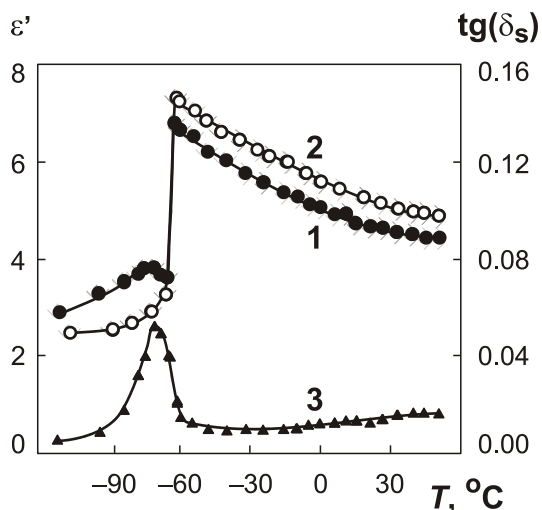


Рис. 3.37. Температурная зависимость диэлектрической проницаемости хлороформа – 1, раствора ПОБ в хлороформе – 2, 3 – тангенса угла диэлектрических потерь раствора ПОБ (Беляев с соавт., 2002).

угла диэлектрических потерь  $\text{tg}(\delta_s)$  для раствора сополимера с 41 мол. % валерата с диэлектрическим инкрементом  $\gamma' = 20$  (кривые 2 и 3 соответственно). Кривая 1 показывает температурную зависимость диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  хлороформа.

Для уменьшения вклада проводимости в диэлектрические потери, данные измерения проводились на частоте  $f = 10^5$  Гц. Диэлектрические потери в хлороформе в несколько раз меньше, чем в исследуемом образце и на рисунке не показаны. Видно, что в достаточно малой температурной области при замерзании раствора имеет место скачкообразное уменьшение действительной компоненты диэлектрической проницаемости раствора и увеличение диэлектрических потерь. Интересно, что скачок диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  у хлороформа заметно меньше, чем у исследуемого раствора биополимера. В области температур от  $-64^\circ$  до  $-120^\circ\text{C}$  в замороженной фазе диэлектрический инкремент  $\gamma'$  становится отрицательным, а его величина с уменьшением температуры падает.

Концентрации растворов 1–2 вес. % являются минимальными для надежного определения диэлектрических инкрементов, поэтому, если предположить, что реализуется условие малости взаимодействия между дипольными молекулами, то по измеряемым величинам «диэлектрического скачка» раствора и растворителя можно рассчитать эффективный дипольный момент  $\mu$  мономерного звена растворенного вещества, используя выражение :

$$\mu = \left( \frac{27\epsilon_0 k T \Delta\epsilon}{C_N (\epsilon_2 + 2)^2} \right)^{1/2},$$

где  $\epsilon'_0$  – диэлектрическая проницаемость вакуума,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $C_N$  – концентрация полимера (число молекул),  $\Delta\epsilon = \epsilon_1 - \epsilon_2 - d\epsilon$ . Здесь  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$  – диэлектрические

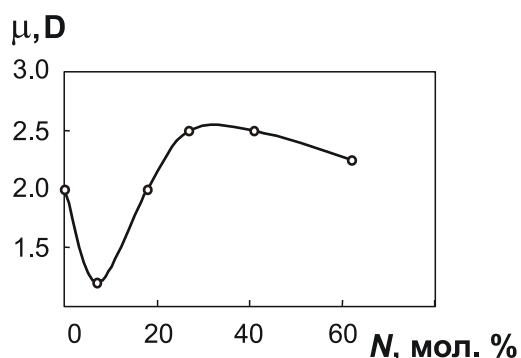


Рис. 3.38. Концентрационная зависимость эффективного дипольного момента сополимеров ПОб-со-ПОВ с разным соотношением мономеров (Беляев с соавт., 2002).

ские проницаемости раствора в жидком и замороженном состоянии,  $d\epsilon$  – «диэлектрический скачок» хлороформа.

Для образца ПОб с наименьшим средневесовым молекулярным весом  $\overline{M}_w \approx 40 \cdot 10^3$  Да (и наибольшим инкрементом) вычисленная таким образом величина  $\mu \approx 2.5$  D (Дебай).

На рис. 3.38 приведены значения дипольных моментов в зависимости от концентрации валерата в растворе.

Видно, что эффективный дипольный момент не является молекулярной константой, а зависимость  $\mu(N)$  является немонотонной и вряд ли может однозначно интерпретироваться влиянием на величину эффективного дипольного момента изменения молекулярной структуры мономерных звеньев, содержащих валерат. Вопрос о корректном определении эффективного дипольного момента в полимерах достаточно сложен, так как даже в предельно разбавленных растворах процессы ориентационной поляризации диполей могут отражать сложный кооперативный характер движения элементов полимерной цепи, который обусловлен жесткостью (гибкостью) макроцепей.

В целом, результаты проведенных экспериментальных исследований позволяют утверждать, что сравнительно высокие значения диэлектрических инкрементов, а также обнаруженная их сильная зависимость от концентрации валерата обусловлены ориентационным дипольным механизмом поляризации макромолекул. Такой вывод хорошо согласуется с выявленными в работе особенностями поведения диэлектрических характеристик от частоты и температуры, в том числе обнаруженными при замораживании растворов.

Отсутствие видимой частотной дисперсии действительной компоненты диэлектрического инкремента растворов в исследуемой области частот  $10^2$ – $10^5$  Гц позволяет считать полимерную цепь достаточно гибкой, легко поляризующейся в электрическом поле путем быстрого вращения дипольных моментов мономерных секторов. Однако выявленная немонотонная зависимость эффективных дипольных моментов от концентрации валерата и средневесовой молекулярной массы заставляют предположить существование более сложных кооперативных ориентационных движений макроцепей. Отметим, что ориентационная поляризация различного масштаба на-



блюдалась в ПОБ даже в твердой аморфной и кристаллической фазах (Ashraf et al., 1999), проявляясь в виде дисперсионных областей на диэлектрических спектрах на определенных частотах и при определенных температурах. Обсуждаемые выше предположения, однако, требуют более детального экспериментального изучения растворов полимеров, в частности в более широком диапазоне частот, охватывающем область диэлектрической релаксации растворов.

Таким образом, из анализа литературы видно, что большинство работ по исследованию физико-химических свойств полиоксикалаканатов посвящены выяснению особенностей процессов кристаллизации и определению молекулярной динамики макромолекул в различных фазовых состояниях. На основании данных рентгена, ДТА, резонансных, диэлектрических и других методов, уже получен достаточно обширный материал, позволяющий выдвигать некоторые предположения относительно кристаллизационных процессов и механизмов молекулярной подвижности макроцепей и мономолекулярных конформеров. В настоящее время имеется достаточно обоснованное понимание основного недостатка биополимеров, связанного со спецификой низкотемпературного процесса кристаллизации, который затрудняет получение конкурентно способных материалов и изделий с приемлемыми физико-механическими характеристиками. Однако уже сейчас предложены оригинальные пути по созданию многокомпонентных сополимеров и введению кристаллизаторов, которые способны улучшить кристаллизационный процесс. Это только начальные изыскания, важно отметить, что поведение макромолекул в растворах, где наиболее отчетливо проявляется индивидуальность макроцепей, а, именно, знание всех тонкостей внутримолекулярной подвижности, является ключом к пониманию проблемы в целом.

## **Глава 4. ПОЛУЧЕНИЕ СМЕСЕЙ И КОМПОЗИТОВ ИЗ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ И ПЕРЕРАБОТКА В ИЗДЕЛИЯ**

Для улучшения коммерческих свойств полиоксиалканоатов, помимо биосинтеза гетерополимерных соединений, существует еще один путь, – химическая модификация биологически синтезированных полимеров и получение смесей и композитов ПОА с природными, а также синтетическими материалами различного состава. Данные исследования только начинаются. Однако уже выявлено, что на базе полиоксиалканоатов в принципе возможно с большим или меньшим успехом получение разнообразных смесей и композитов с улучшенными физико-механическими свойствами.

### **4.1. Смесей и композиты на основе полиоксиалканоатов**

К настоящему моменту достаточно широко исследуется возможность получения композитных материалов на базе биоразрушаемых полиоксиалканоатов, в основном полиоксибутирата, а также его смесей с оксивалератом, с использованием широкой гаммы различных материалов, включая полиэтиленоксид (Avella, Martuscelli, 1988; Avella et al., 1991), поливиниловый спирт (Yoshi et al., 1995), атактический синтетический полиоксибутират (Kumaga and Doi, 1992; Abe and Matsubara, 1995), полилактид (Blüm and Owen, 1995; Kayama and Doi, 1997; Yoon et al., 2000), винилацетат (Yoon et al., 1998), полиизопрен (Yoon et al., 1999), полиэтиленгликоль (Hao and Deng, 2001), целлюлозу (Maekawa et al., 1999), поликапролактон (Chum, Kim, 2000) и др.

В одной из ранних работ этого направления изучена смешиваемость полиоксибутирата (ПОБ) с полиэтиленоксидом (ПЭО) в расплаве (Avella and Martuscelli, 1988). Смешение ПОБ и ПЭО происходило в результате взаимодействия карбонильных групп полиоксибутирата и водорода в  $\text{CH}_2$  группе полиэтиленоксида. Добавление полиэтиленоксида к полиоксибутирату вызывало замедление процесса кристаллизации ПОБ. Были изучены характеристики расплавов смеси с различным соотношением компонентов, при этом существенных эффектов в зависимости от химического состава смеси не было выявлено.

С целью поиска стабилизирующих факторов для полиоксиалканоатов в одной из первых работ этого плана изучен характер поведения тройных полимерных смесей, получаемых из полиоксибутирата

(ПОБ), полиэтиленоксида (ПЭО) и полиэпихлорогидрина (ПЭХГ) (Goh and Ni, 1999). Авторами было получено и исследовано 18 тройных смесей с различным соотношением компонентов. В качестве индикатора смешения была принята прозрачность получаемых смесей при условии разницы показателя преломления полимеров свыше 0.01. Поскольку показатель преломления у ПЭХГ существенно больше, чем у ПОБ и ПЭО, поэтому прозрачность исследуемых тройных смесей является хорошим индикатором смешиваемости. Как оказалось, все они являются полностью взаимно растворимыми с композиционно зависимой температурой перехода в стеклообразное состояние. Авторами было установлено, что изменение температуры кристаллизации данной смеси лежит в широком диапазоне, от  $-2$  до  $-53^{\circ}\text{C}$ .

В работе (Maekawa et al., 1999) изучена возможность получения смесей полиоксибутирата с пропионатом целлюлозы. Установлено, что данная система полностью смешиваемая. Изучены структура и фазовые переходы смесей при нагревании и показано улучшение механических свойств смеси (повышение эластичности) по сравнению с полиоксибутиратом.

Осуществлено также успешное смешивание ПОБ с целлюлозо-ацетатом, с целлюлозо-ацетат-пропионатом, а также смешение этих целлюлозных компонент с сополимером 3-ПОБ-со-3-ПОВ (Xing et al., 1997). Для смешивания использовали растворы этих веществ в хлороформе с последующей подготовкой твердой пленки высушиванием смеси в вакууме при  $T = 80^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Следует отметить, что существенное изменение температуры перехода из стеклообразного в подвижное аморфное состояние  $T_g$  происходило лишь при очень больших добавках целлюлозы, более 80 вес. %. Характер изменения  $T_m$  зависит, как установлено, от концентрации целлюлозы. Однако при небольших добавках температура плавления уменьшается, а при концентрациях свыше 50 % – увеличивается. Это может свидетельствовать о принципиальной возможности получения композитов на основе ПОБ и целлюлозы. Получена и изучена система: поли( $\beta$ -оксибутират) – поли( $p$ -винилфенол) и установлено, что эти составы термодинамически смешиваемы и представляют из себя однородную систему.

В работе показано, что не все многокомпонентные системы, включающие полиоксиалканоаты, смешиваются друг с другом. В частности, при попытке смешивания ПОБ с полиметилметакрилатом (ПММА) получен отрицательный результат. В то же время в другой работе автора (Yoon et al., 1997) показано, что несмотря на то, что смешение поли(3-гидроксибутирата) с поли(этилен-винил-ацетатом) (ПЭВА) не происходит, при увеличении доли ПЭВА в смеси до 85 % можно получить смеси. При этом показано, что температура плавления смеси резко уменьшается в соответствии с уравнением Флори–

Хаггинса. Это, по-видимому, говорит о возникновении совместимости этих компонентов лишь при определенной концентрации. В следующей работе авторов (Yoon et al., 1999) для улучшения механических свойств полиоксибутирата (ПОБ) его смешивали с поли(*цис*-1,4-изопреном) (ПИП). В ходе изучения температурных характеристик расплавов этих компонентов их смешиваемости, однако, установлено не было. Для получения эффекта смешивания был добавлен третий компонент – поливинилацетат (ПВА). С увеличением доли ПИП с ПВА в трехкомпонентной системе температура стеклования домена ПОБ возрастала, в то время, как температура стеклования доменов ПИП оставалась практически постоянной. Это позволило заключить, что около половины доли ПВА распределяется в доменах ПОБ. Размер дисперсионной фазы тройной смеси был меньше, чем бинарной системы. Прочностные свойства тройной смеси были выше, чем у двойной. Совместимость полиоксибутирата с полилактидом исследована в работе (Yoon et al., 2000). При этом в качестве пластифицирующих агентов были использованы полиэтиленгликоль и поливинилацетат. Был использован полилактид (ПЛ) различного молекулярного веса. Полное смешение полилактида с полиоксибутиратом без пластификаторов происходило только при использовании низкомолекулярного ПЛ (11 700 и ниже), в то время, как при использовании ПЛ, имеющего 56 000 или 190 000 смешения не происходило. Применение пластификаторов не влияло существенно на механические свойства ПОБ/ПЛ. Когда ПОБ смешивали с сополимером полилактида с полиэтиленгликолем, температура стеклования смеси была выше, чем у ПОБ. Увеличение температуры стеклования в процессе смешивания зависело от соотношения компонентов. По мере увеличения доли ПЭГ в сополимере ПЭГ/ПЛ температура стеклования тройной смеси снижалась. Это может быть следствием того, что фрагменты ПЭГ внедряются в аморфную фазу полиоксибутирата.

Смешиваемость и структура бинарной смеси высокомолекулярного полилактида (680 000) с атактическим полиоксибутиратом различной молекулярной массы (9 400–140 000) изучены в работе (Ohkoshi et al., 2000). С увеличением доли полиоксибутирата в смеси наблюдали снижение температуры стеклования и общий пик плавления при 200°C как показатель смешиваемости низкомолекулярного ПОБ с полилактидом при соотношении компонентов 1:1. Скорость роста сферолитов полилактида возрастала по мере добавления низкомолекулярного ПОБ. Показано, что даже небольшие добавки низкомолекулярного полиоксибутирата увеличивают кристалличность полилактида. Однако при использовании высокомолекулярного ПОБ смешения его с полилактидом не происходило; в расплаве наблюдали два пика плавления.

В работе (Gürsel et al., 1998) исследован процесс получения композитов на основе биodeградируемых сополимеров оксibuтирата с оксивалератом и недеградируемого синтетического полигидроксиэтилметакрилата. В зависимости от доли оксивалерата в сополимере (исследован диапазон от 7 до 22 мол. %) с ее увеличением улучшались механические свойства нового композита. Так, модуль упругости и абсолютная прочность возрастали на порядок. В полученных из композита мембранах пористость возрастала с увеличением доли оксивалерата в сополимере. Сделан вывод о перспективности композита биологического и синтетического полимеров для медицинских применений.

Частичное смешивание наблюдалось в композитах поли[(*R*)–3-оксibuтирата] с 6-оксигексаноатом (Abe et al., 1999; 2000). Такие сополимеры имеют отличающуюся от полиоксibuтирата и полиоксигексаноата кинетику кристаллизации и морфологию, включая размер сферолитов. Однако на поверхности таких пленок появлялась отдельная монокристаллическая фракция (*R*)-3-ПОб, в результате «выдавливания» ее из кристаллической решетки полиоксигексаноата. В работе (An et al., 1999) получены смеси ПОб с поливинилацетатом. В ходе изучения кинетики кристаллизации и плавления смесей оксibuтирата с поливинилацетатом установлено, что добавление винилацетата приводило к снижению общей скорости кристаллизации ПОб, но не влияло на механизм кристаллизации и геометрию растущих кристаллов ПОб.

Смеси сополимеров оксibuтирата с оксивалератом и поликапролактона, полученные растворением в хлороформе, изучены с применением ДСК (Chun and Kim, 2000). Установлено, что добавки капролактона подавляют кристаллизацию сополимера. Температура кристаллизации сополимера в данной смеси снижалась на 8–12°C по сравнению с чистым ПОб-со-ПОВ. Получены смеси бактериального и синтетического полиоксibuтирата с полиэпихлорогидрином (ПЭПХГ) и изучена проницаемость мембран на их основе для водяного пара и CO<sub>2</sub>. Как оказалось, добавление атактического полиоксibuтирата к смеси увеличивало проницаемость материала вследствие снижения уровня кристалличности. В то время как добавление ПЭПХГ к ПОб снижало проницаемость для водяного пара и CO<sub>2</sub> (Miguel et al., 2001).

Химическая модификация полимеров и синтез их производных в настоящее время превращается в важное направление химии высокомолекулярных соединений.

Полиоксibuтират при кислотном метанолизе гидролизуется с образованием низкомолекулярных полимерных цепей (DP = 26). Установлено, что данные продукты гидролиза ПОб, а также олигомеры можно использовать для получения высокомолекулярных

блок-сополимеров путем растягивания полимерной цепи (Hirt et al., 1996). Гидроксильные группы образуемых цепей реагируют с  $AlEt_3$  с образованием макроиницирующих участков 3-ПОБ-О- $AlEt_2$ . Данные фрагменты могут быть использованы для завершения кольцевой полимеризации  $\epsilon$ -капролактона и лактидных мономеров и получения ди-блоксополимеров с различной длиной цепей: 3-ПОБ-поликапролактона (ПКЛ), 3-ПОБ-D,L-полилактида и 3-ПОБ- L-полилактида А-Б (Reeve et al., 1993; Asrar et al., 1999).

Поли[RS]-3-оксибутират, химически синтезированный в реакции полимеризации с  $\beta$ -капролактоном в присутствии 1,4-бутандиола и имеющий вторичные терминальные гидроксигруппы в середине цепи, был использован для получения нескольких типов блок-сополимеров с L-лактидом (Hiki et al., 2000). В зависимости от степени полимеризации блоков температурные характеристики блок-сополимеров [RS] полиоксибутирата с полилактидом существенно варьируют, а при изменении соотношения компонентов можно успешно контролировать механические свойства материала (таблица 4.1).

3-ПОБ-со-3-ПОВ-диол, полученный транс-этерификацией сополимера и этиленгликоля и использованием дибутилен-дидарата в качестве катализатора, имел  $T_{пл}$  140°C и значения  $M_e$  2 300 Da. Есть сведения о применимости сополимера 3(ПОБ-со-ПОВ) в композиции с различными диолами для получения высокомолекулярных микрофазно-сегрегированных блок-сополиэфиров типа ПОБ-со-ПОВ-уретаны (Hirt et al., 1996). Модуль упругости данных блок-сополимеров может составлять от 40 МПа до 1.3 ГПа в зависимости от размера фракции кристаллизованного 3(ПОБ-со-4 %ПОВ)-диола в блок-сополимере, тогда как не кристаллизованные типы сегментов практически не влияют на величину модуля упругости материала. Возможно улучшение механических свойств данного материала, например, разрывная прочность возрастает, а удлинение при разрыве уменьшается с увеличением в блок-сополимере доли 3(ПОБ-со-ПОВ)-диола.

**Таблица 4.1**  
**Механические свойства полимерных пленок из блок-сополимера {полилактид – [(RS)-ПОБ]-полилактид- [(RS)-ПОБ]} (Hiki et al., 2000)**

| Соотношение поли(3оксибутират/лактид) | Модуль упругости (МПа) | Разрывная прочность (МПа) | Разрывное удлинение (%) |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 100/0                                 | 24                     | 15                        | 610                     |
| 56/44                                 | 30                     | 10                        | 200                     |
| 47/53                                 | 130                    | 14                        | 150                     |
| 31/69                                 | 160                    | 15                        | 86                      |
| 0/100                                 | 800                    | 39                        | 7.2                     |

Данные блок-сополимеры рассматриваются в качестве подлежащих стерилизации биоматериалов для получения биodeградируемых имплантатов. Время эксплуатации таких имплантатов в зависимости от доли отделяемых «мягких сегментов» может исчисляться от нескольких дней до нескольких лет (Hirt et al., 1996). Случайное расщепление аморфной части данных блок-сополимеров может приводить к образованию мелких с низкой молекулярной массой фрагментов полиоксибутирата, которые фагоцитируются макрофагами и деградируют внутри фагосом *in vitro* и *in vivo* (Ciardelli et al., 1995).

Имеется серия работ, в которых изучены смеси атактического, синтезированного химически поли[(R,S)-3-оксибутирата], с изотактическим ПОб, синтезированным биологически (Focarete et al., 1998; Miguel et al., 2001). Установлено, что добавление атактического полиоксибутирата к биологическому существенно влияет на кристаллизационное поведение изотактического ПОб, а также свойства и проницаемость получаемых мембран, сохраняя, однако, свойства биоразрушаемости. Добавление поликапролактона к сополимерам ПОб-сОПВ также существенно влияет на параметры кристаллизации и термальные свойства материала (Chum, Kim, 2000). Исследовано влияние добавок полиэтилен-*block*-полилактида к смесям поли[(R)-3-гидроксибутирата]/поли(L-лактида) (Yoon et al., 2000) и установлено, что возможность совместимости этих двух смесей определяется молекулярной массой. Высокомолекулярный полилактид (свыше 56 kDa) не образует совместимых смесей с полиоксибутиратом. Однако свойства смесей, совместимых или не совместимых, не очень существенно различаются между собой. Именно такое смешивание обеспечивает получение биodeградируемых материалов на основе синтетических полимерных соединений с включениями биопластиков.

Для фармакологических, физиологических и медицинских целей интересны смеси (R)-4-амино-3-оксибутирата (4-АПОБ, этил-(R)-4-хлоро-3-оксибутирата (ЭХПОБ), метил-(R)-4-хлоро-3-оксибутирата, (S)-3-гидрокси- $\gamma$ -бутиролактона (Suzuki et al., 1999). Выявлено, что эти смеси обладают высокой оптической активностью. Большой интерес вызывает возможность использования полиоксиалканоатов для получения прочных, биodeградируемых и биоактивных керамик для реконструкции дефектов костных тканей. Оказалось, что ПОА, главным образом полиоксибутират и сополимеры оксибутирата с оксивалератом, образуют биосовместимые композиты с различными типами гидроксиапатитов (Doyle et al., 1991; Lukinska and Bonfield, 1997; Turesin et al., 2001 et al.).

Следует отметить, однако, что в настоящее время выбрать главный путь к улучшению и стабилизации свойств биополимеров не представляется возможным, так как в большинстве случаев их основные гидродинамические, физико-механические и динамические молекулярные свойства еще не изучены.

## 4.2. Процессы переработки полиоксиалканоатов

Полиоксиалканоаты относительно сложны для переработки из-за их близости температуры плавления с температурой деградации, а также хрупкости. Есть также данные о нестойкости и термической деградации расплавов ПОА. Вследствие этого индекс текучести расплавов может во времени изменяться. Процесс также сопровождается образованием летучих продуктов в результате термической деградации. Низкая скорость кристаллизации ПОА приводит к липкости изделий, получаемых из расплава (пленки, волокна и др.).

Выделяемые из биомассы продуцентов образцы ПОА в принципе могут быть высокой степени чистоты. Поэтому при расплаве, например, химически чистых образцов ПОБ, в ходе кристаллизации происходит гомогенная нуклеация, однако плотность нуклеации ПОБ ниже, чем у полиэтилена и полипропилена. Тем не менее, возрастающая скорость при первичной нуклеации ПОБ может быть сопоставима с таковой у полипропилена и нейлона. Низкая скорость нуклеации у ПОБ приводит к образованию крупных сферолитов внутри полимера. Крупные сферолиты в значительной мере могут ухудшать физические и механические свойства полимеров. Изделия, получаемые при термической переработке ПОА, становятся со временем хрупкими (стареют).

Для исправления ситуации применяют различные подходы, включая использование пластификаторов, агентов, влияющих на процесс кристаллизации полимера, модификацию структуры полимеров, а также получение смесей и композитов с использованием различных соединений.

### 4.2.1. Роль нуклеирующих агентов в процессах кристаллизации ПОА

Проблеме кристаллизации ПОА уделено достаточно большое внимание в литературе. Однако многие вопросы, касающиеся кристаллизационных процессов и макромолекулярных свойствах сополимеров в том или ином фазовом состоянии, остаются не выясненными.

Общая скорость кристаллизации полимеров может быть увеличена применением нуклеирующих агентов, которые обеспечивают кристаллизацию расплавленных или стеклоподобных смол путем увеличения количества центров кристаллизации внутри полимера. Последнее приводит к уменьшению диаметра сферолитов, более быстрой потере клейкости, возрастанию механической прочности и сокращению длительности циклов термического процесса. По мере остывания расплава полимера и кристаллизации происходит выделение тепла. Область температуры выше кристаллизации полимера – это область пика на ДСК термограмме, форма которого характери-



зует кристаллизационное поведение материала. Добавление нуклеирующих агентов ведет к увеличению области кристаллизации и области этого пика.

Одна из идей оказания влияния на скорость процесса кристаллизации полимеров – например, использование нитрида бора (Withe and Hay, 1999). Установлено, что помимо нитрида бора, на увеличение скорости зародышеобразования кристаллической фазы полимера оказывают влияние также сахарин и фталимид, микрочастицы талька и слюды, мел, карбонат кальция и гидроксиапатит кальция (Webb, 1998). Нитрид бора широко используют в качестве нуклеирующего агента для ПОБ и других полиоксиалканоатов. Эффективным нуклеирующим агентом в водных растворах является  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Нитрид бора, который способен увеличить температуру кристаллизации до  $110\text{--}130^\circ\text{C}$ , оказался наиболее подходящим компонентом для кристаллизации полиоксиалканоатов. Недостатком нитрида бора является лишь то, что этот реагент не подвержен биодegradации. Поэтому в качестве кристаллизатора к подготовленному заранее расплавленному сополимеру ПОБ-со-ПОВ можно добавлять чистый полиоксибутират, влияние которого на начало и температурный диапазон кристаллизации аналогичен нитриду бора. Добавление ПОБ способствует появлению значительного количества сферолитов, своеобразной полимерной текстуры (Webb, 1998). Методом локальной инфракрасной спектроскопии было показано, что излишки кристаллизационных агентов вытесняются из кристаллизованных сферолитных областей в область фронта кристаллизации, а по сечению сферолитов образуются многофазные системы, включающие сахарин, фталимид или BN.

В работе (Liggat, 1999d) в качестве ядер кристаллизации сополимера ПОБ-со-ПОВ (с включением оксивалерата 12 мол. %), имеющего температуру плавления ( $T_{\text{пл}}$ )  $149.9^\circ\text{C}$ , исследованы кристаллы 3-ПОБ. При внесении 5 % (по массе) кристаллов ПОБ температура кристаллизации сополимера снижалась до  $88.7^\circ\text{C}$ , и теплота кристаллизации составила 45.7 Дж/г; при 1 р.н.г. внесении кристаллов 3-ПОБ температура кристаллизации составила  $70.3^\circ\text{C}$ , а теплота кристаллизации – 41.9 Дж/г. В отсутствие кристаллов 3-ПОБ температура кристаллизации не определялась. Автором показано, что для сополимера 3-ПОБ-со-3-ПОВ с высоким содержанием оксивалерата более эффективным нуклеирующим агентом в сравнении с нитридом бора является смесь циклогексилфосфоной (ЦГФК) кислоты и стеарата цинка (СЦ). Так, при внесении 0.10 р.н.г. ЦГФК и 0.385 р.н.г. стеарата цинка к ПОБ-со-ПОВ (включение оксивалерата 22 мол. %) в сравнении с добавлением 1 р.н.г. нитрида бора при температуре  $80^\circ\text{C}$  время полукристаллизации и пик  $\frac{1}{2}$  теплоты кристаллизации в обоих случаях были сходными и составили, соответственно, 1.26 и

1.39 мин. и 19.85 и 19.26 Дж/г. Однако при температуре кристаллизации 50°C время полукристаллизации для смеси ЦГФК/СЦ составило 0.40 мин. против 3.91 мин. при использовании нитрита бора; а пик ½ теплоты кристаллизации составил 47.09 против 11.73 Дж/г, соответственно. Таким образом, при более низкой температуре кристаллизации исследованная смесь существенно ускоряет скорость кристаллизации сополимера и улучшает энергию кристаллизации. Применение ПОА с более высоким содержанием оксивалерата, возможно, позволит использовать более низкие температуры для плавления и более короткие по времени циклы. Однако для сополимеров с низким содержанием оксивалерата оба типа нуклеирующих агентов одинаково влияют на параметры процесса кристаллизации (Herring and Webb, 1990).

Недавно в качестве нуклеирующих агентов исследованы органические соединения, имеющие на концах 2 остатка фосфоновой кислоты, служащие нуклеирующими агентами и обеспечивающие получение продуктов высочайшей чистоты. Так, при внесении 0.2 р.н.г. 1-гидроксиэтилидендифосфоновой кислоты в сополимер ПОБ-со-ПОВ (3 мол. % оксивалерата) получено снижение температуры кристаллизации до 78°C при теплоте кристаллизации 55 Дж/г. Комбинация данного агента со стеаратом кальция или магния также хороша в качестве нуклеирующего агента (Asrar and Pierre, 1999).

#### 4.2.2. Роль пластификаторов

Применение мономерных полимерных пластификаторов при переработке полиоксиалканоатов позволяют улучшить свойства полимеров и изделий в результате, как установлено, инициации вторичной кристаллизации (таблица 4.2). Пластификаторы, оказывая влияние на реологические свойства расплавов полимеров, позволяют в отдельных случаях облегчить процедуру переработки расплавов.

Таблица 4.2

**Влияние пластификаторов на физические и механические свойства полиоксибутирата (Ishikawa et al., 1991)**

| Пластификатор |         | Температурные характеристики (°C) |          |          |                               | Модуль упругости (МПа) | Разрывная прочность (МПа) | Ел брик (%) |
|---------------|---------|-----------------------------------|----------|----------|-------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|
| Тип           | Вес (%) | $T_{стекл}$                       | $T_{кр}$ | $T_{пл}$ | Энергия кристаллизации (Дж/г) |                        |                           |             |
| ГТА           | 10      |                                   |          |          |                               | 1020                   | 27                        | 12          |
| ГТА           | 20      | -22                               | 24       | 164      | 73.2                          | 680                    | 20                        | 64          |
| ГТБ           | 20      | -29                               | 14       | 165      | 75.2                          | 630                    | 20                        | 26          |
| ГМС           | 20      | -22                               | 22       | 162      | 74.6                          | 820                    | 20                        | 20          |
| ГТФ           | 20      | -29                               | 15       | 164      | 67.6                          | 960                    | 25                        | 10          |

ГТА – глицеролтриацет, ГТБ – глицеролтрибутират, ГМС – глицеролмоностеарат, ГТФ – глицеролтрифосфат

Установлено, что для ПОБ и ПОБ-со-ПОВ в качестве пластификаторов могут быть использованы: 1) высококипящие эфиры ряда основных кислот (фталаты, изофталаты, цитраты, фумараты, глутамат, фосфаты или фосфиты); 2) высококипящие эфиры полиоксипиртов, особенно, гликоля, полигликоля и глицерина и 3) ароматические сульфонамиды. Для получения достаточно прочных, не слишком хрупких частиц полимеров, например ПОБ, достаточно применение данных пластификаторов в количестве 6–12 p.h.r. (вес/к весу) (Ishikawa et al., 1991) (таблица 4.2).

Глицеролтриацетат (триацетин) и глицеролтрибутират являются эффективными пластификаторами для ПОБ и ПОБ-со-ПОВ. С применением ЯМР  $^{13}\text{C}$  установлено, что подвижность 3-ПОБ цепи возрастает при добавлении триацетина, однако последний из-за высокой летучести легко испаряется при плавильном процессе, а также в ходе хранения полимерных изделий. Поэтому мономеры пластификатора со временем элюируют, что сопровождается ухудшением свойств изделий. В качестве пластификатора для ПОА использован ацетил-3-N-бутил цитрат, и показано, что его применение эффективно (Hammond et al., 1994). Выявлено также, что ди-N-бутил фталат обладает высоким пластифицирующим эффектом по отношению в 3-ПОБ, и его применение позволяет снизить температуру стеклования материала от 8 до  $-90^\circ\text{C}$  (Gassner and Owen, 1994). В присутствии данного пластификатора ПОБ способен кристаллизоваться при комнатной температуре. Энтальпия коррелирует со снижением доли ПОБ в смеси, вследствие этого способность полиоксибутирата кристаллизоваться не снижается в присутствии пластификатора. Так, при 39 % содержании пластификатора температура плавления полимера снижается от 175–185 до  $150^\circ\text{C}$ . Хорошим пластифицирующим эффектом обладают также полиэфиры и эпоксицированное соевое масло (Hammond et al., 1994). Недавно описан ряд олигоэфиров, способствующих совместимости ПОА с другими деградируемыми полиэфирами (Asrar and D'Haene, 2001a, b).

#### **4.2.3. Реология расплавов ПОА и ее влияние на переработку**

Одним из ключевых свойств термопластичных полимеров являются реологические характеристики расплавов, прежде всего, вязкость при удлинении (extensional viscosity). «Толщина при удлинении» и увеличение вязкости при удлинении (или текучести) важны для стабилизации полимеров в процессах их переработки, включая такие процессы, как вытягивание из расплава (выдувание пленок, вытягивание и скручивание волокон, покрытия расплавами и т. п.). Полимеры, имеющие низкую прочность расплавов, не способны противостоять нагрузкам, имеющим место при термическом процессе, не стабильны и подвержены деструкции.

Реологические характеристики расплавов сополимеров ПОб-со-ПОВ зависят существенно от параметров обработки. По мере снижения вязкости расплава сополимера значительно увеличивается скорость обрыва (*shear thinning*). Увеличение молекулярного веса полимера ведет к возрастанию сдвиговой вязкости (*shear viscosity*) и вязкости при удлинении (*extensional viscosity*). Влияние молекулярного веса, как установлено, более значительно на величину *extensional viscosity*, чем на «*shear viscosity*» (Asrar and Pierre, 2000a).

Прочность расплава может быть повышена ветвлением линейных полимеров. Разветвленные композиты ПОА могут быть получены путем введения реагентов в ходе экструзии полимера, когда температура экструзии и время реакции достаточно для плавления ПОА и выше температуры разложения 3-радикального индуктора, например, пероксида. Установлено, что при введении пероксида в расплавы ПОА инициируются конкурирующие реакции, приводящие к разрывам полимерной цепи и встраиванию в нее боковых цепей. Термическая декомпозиция ПОА, как известно, ведет к снижению молекулярного веса, а реакция разветвления, наоборот, – к повышению. Варьируя температуру экструзии и содержание 3-радикального индуктора, можно контролировать конечный молекулярный вес и степень разветвления полимеров (Asrar and D'Haene, 2001a, b). Авторами работы установлено, что наиболее эффективная концентрация пероксида составляет от 0.05–0.1 до 0.3 весовых %. Показано, что в результате ветвления линейных полимеров замедляются процессы старения.

Результаты сравнения реологических характеристик линейных и разветвленных 3-ПОб-со-3-ПОВ, приготовленных с 0.2 вес. % дикамил пероксида, представлены на рис. 4.1, из которого следует, что *shear viscosity* линейного и разветвленного полимеров идентичны, т. к. она зависит в основном, от молекулярного веса полимера. Однако «*extensional viscosity*» намного выше у разветвленного материала по сравнению с линейным (D'Haene et al., 1999).

Современный подход для получения разветвленных ПОА заключается во введении в состав питательной среды в ходе культивирования накапливающих полимеры бактерий пентаэритритол-этоксилата в качестве предшественника реакции ветвления. При последующей термической обработке выделенного из биомассы полимера происходит инициация реакции ветвления линейных ПОА, например, полиоксибутирата (Asrar et al., 2001b).

Расплавы полиоксиалканоатов пригодны для переработки в изделия в промышленных условиях на стандартном оборудовании в связи с тем, что их точка плавления близка к таковой у широко применяемых термопластов типа полиэтилена и полипропилена. Установлена также применимость ряда традиционных технологических процессов для переработки расплавов ПОА, включая экструзию, ли-

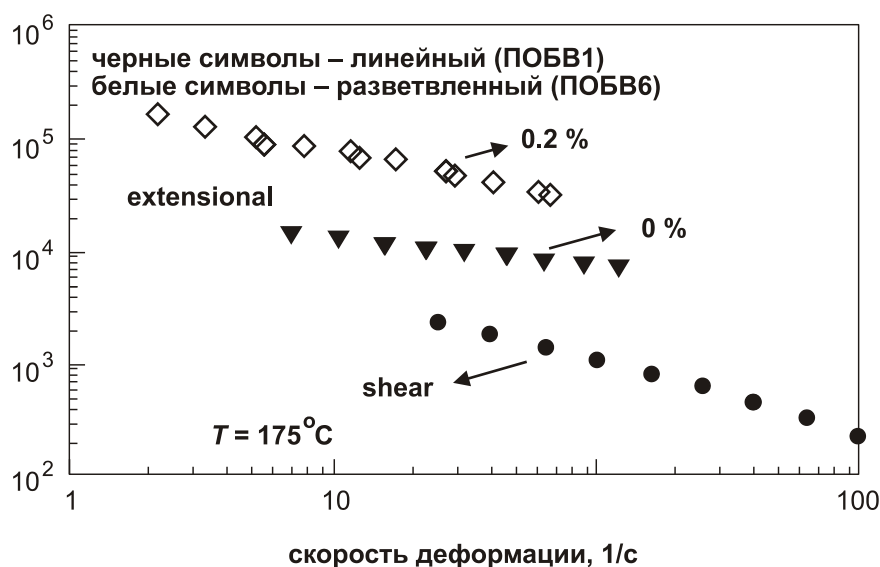


Рис. 4.1. Зависимость текучести расплавов линейных и разветвленных полимеров от скорости деформации (Asrar et al., 2000 b).

тье под давлением, литье с раздувом, термопереработку, ориентированное и неориентированное литье или выдувку пленок, моно- и мультифиламентное прядение волокон, вспенивание и покрытие (Darnell et al., 1986).

Твердофазная экструзия сополимеров ПОБ-со-ПОВ реализуется ниже температуры плавления материала ( $135\text{--}150^{\circ}\text{C}$ ) в зависимости от содержания оксивалерата в сополимере. Полученные таким образом образцы изделий, однако, не обладали выраженной ориентацией полимерной цепи по направлению экструзии. Повышение температуры экструзии близко к температуре плавления повышает качество изделий, в частности, их механическую прочность (Wang et al., 1996).

Литье под давлением применимо для расплавов ПОА на оборудовании с фильерами, применяемыми, например, для полиэтилена, имеющих соотношение длины к диаметру у форсунок, равное 20/1. Следует, однако, учитывать время пребывания расплава в плавильной емкости с целью предотвращения термической деградации материала. Оптимальная температура процесса литья для быстрой кристаллизации полимера при минимальном времени цикла составляет  $60^{\circ}\text{C}$  (Darnell et al., 1986). Процесс переработки ПОА экструзионным литьем под давлением с поддувом возможен на аппаратах с одной или несколькими насадками, оборудованными фильерами для переработки полиэтилена и соотношением длины к диаметру 24/1. Данный процесс минимизирует брак в ходе переработки ПОА.

Описан процесс получения свободных пленок из сополимера ПОБ-со-ПОВ путем коэкструзии с применением в качестве подложки

**Таблица 4.3**

**Влияние молекулярной массы 3(ПОБ-со-ПОВ) с 8 мол. % оксивалерата на прочностные свойства пленок (Asrar and Pierre, 2000a)**

| Молекулярный вес (kDa) | Удлинение при растяжении (%) ориент./неориент. | Разрывная прочность (Мпа) ориент./неориент. |
|------------------------|--|---|
| 796                    | 90/34  | 120/27                                      |
| 625                    | 80/15  | 108/26                                      |
| 525                    | 80/11  | 62/22                                       |
| 390                    | не стабилен,<br>не подвержен ориентированию    |   |

двух слоев пленок из полиолефинов. Процесс вытягивания и ориентирования происходит при участии этих двух слоев неразрушаемых полиолефинов. После завершения процесса кристаллизации пленки из ПОБ-со-ПОВ полиолефиновые слои удаляются. Полученные пленки из данного сополимерного ПОА в дальнейшем можно ламинировать другими, в т. ч. водорастворимыми пленками (Martini et al., 1989). Многослойные пленки могут быть получены коэкструзией при использовании в качестве прилежащих слоев других типов разрушаемых пленок. При этом наружные слои пленок не удаляются после кристаллизации ПОА, а остаются в качестве интегральной части биodeградируемых мультислойных пленок (Wnuk et al., 1994).

Другой подход переработки ПОА в изделия включает применение пластификаторов, нуклеирующих агентов и иных агентов, например полиэтилена, в качестве матрицы, на которую выдувают пленки из ПОА (De Micheli et al., 1996), которые впоследствии можно подвергнуть ориентированию вытягиванием, придав им очень высокие товарные свойства (Asrar and Pierre, 2000a). Такие пленки более прочны по сравнению с неориентированными и имеют более сложную структуру и, как установлено, сохраняют свои исходные механические свойства длительное время (до 90 сут.), без признаков старения. Сравнительная характеристика таких пленок с неориентированными представлена в таблице 4.3.

### 4.3. Получение изделий из полиоксиалканоатов

Как было отмечено выше, потенциально полиоксиалканоаты можно перерабатывать различными методами, прежде всего, из расплавов, а также холодным прессованием, поливом из растворов, гелтехнологией и др. Наличие выраженного диапазона между температурой начала плавления (150°C) и температурой начала разложения ( $T_{разл.} = 270^\circ\text{C}$ ) является существенно важным технологическим свойством полиоксиалканоатов, так как делает возможным получение из

них различных изделий (пленок, нитей, полых форм и пр.) общепринятыми термическими методами переработки полимерных материалов.

#### 4.3.1. Волокна из полиоксиалканоатов

Расплавы ПОА достаточно часто используются для получения волокон. Однако в ходе прядения волокон из расплавов ПОБ и сополимеров ПОБ-со-ПОВ необходим контроль кристаллизации в течении фазы вытягивания. Данные полимеры, как известно, не кристаллизуются упорядоченно и содержат также аморфную фазу, а волокна не могут быть вытянуты из расплава аморфной фазы. Для правильного процесса кристаллизации полимера необходимо строго контролировать время и температуру процесса для возможности дальнейшего проведения ориентирования волокон с целью придания им прочности и необходимых физико-механических свойств. Успех ориентирования волокон зависит от кинетики кристаллизации полимера.

Есть ряд работ, посвященных оптимизации процесса получения шовных волокон из полиоксиалканоатов. Монофиламентные волокна, полученные прядением из расплава или раствора ПОБ, могут иметь удовлетворительные физико-механические свойства, в том числе разрывную прочность (свыше 300 МПа) и модуль упругости (до 10 ГПа), обладая при этом высокой степенью обратимой деформации (3 г/d) (Mochizuki et al., 1994), (Gordeyev, Nekrasov, 1999), Schmack et al., 2000, Gordeyev et al., 2001).

В одной из первых работ, посвященных исследованию волокон из полиоксиалканоатов (Miller and Williams, 1987), было доказано, что монофильные волокна из сополимеров оксибутирата с оксивалератом устойчивы к воздействию биологических сред *in vitro* и *in vivo*. Волокна имели следующие характеристики: модуль упругости 4.2 КПа; прочность на разрыв 220–230 МПа. Волокна длительное время (до года) не изменяли свои прочностные свойства при экспонировании в фосфатном буфере при 37°C и имплантированные внутрибрюшинно лабораторным мышам.

Более прочные ориентированные волокна были получены С. А. Гордеевым с соавторами (Gordeev and Nekrasov, 1999; Gordeev, Nekrasov, 1999). В работе использовали полиоксибутират, синтезированный бактериями *Al. eutrophus* В 5786, выделенный и очищенный в Институте биофизики СО РАН, имеющий величину  $M_v$   $3 \times 10^5$  г/моль. Авторы получили нити прочностью до 290 МПа с модулем упругости 3–4 КПа. Микрофотографии структуры поверхности таких нитей представлены на рис. 4.2.

Далее авторы показали, что, варьируя этапы процесса переработки полимера, можно получить волокна, имеющие разрывную прочность от 103 до 360 МПа и значения статического и динамического модуля, соответственно, до 5.6 и 7.5 ГПа при стабильном со-

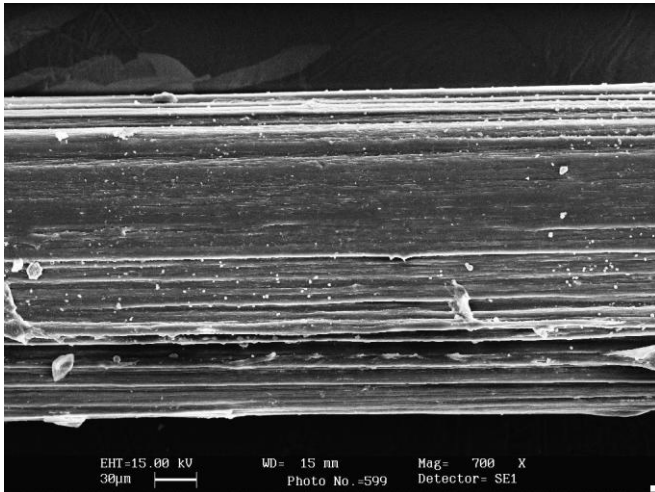


Рис. 4.2. РЭМ снимки топографии поверхности ПЭТ нити. Маркер 30 мкм (Шишацкая с соавт., 2002ж)

хранении данных показателей после получения в течение длительного времени, до 100 и более суток (таблица 4.4) (Gordeev et al., 2001).

В серии работ японских авторов рассмотрен процесс получения монопольных волокон из расплава ПЭТ и сополимеров ПЭТ-со-ПЭТ и исследованы структура и свойства таких волокон (Yamane et al., 1995; 1997).

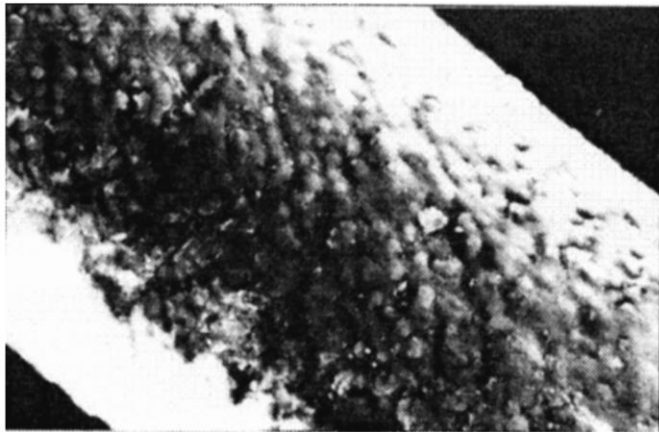
С помощью рентгена было установлено, что полиоксибутират в полученных волокнах представлен двумя модификациями кристаллов и имеет бимодальную ориентацию цепей. Оси цепей первой популяции кристаллов ориентированы преимущественно вдоль оси волокна; в то время, как оси цепей второй популяции кристаллов ориентированы в поперечном направлении. В ходе последующего закаливания изделий при 100°C доля популяции кристаллов первого типа существенно преобладает над второй популяцией, однако при повышении температуры соотношение изменяется в пользу второй популяции. Полученные после закаливания волокна с увеличенной долей поперечно ориентированных цепей становятся более прочными. В одной из последних работ авторов (Yamane, 2001a) изучены структура и механические свойства волокон, полученных прядением из расплава полиоксибутирата. Используя технологию формования волокон из расплава, варьируя при этом температуру (75, 100, 125 и

Таблица 4.4

**Прочностные свойства нитей, полученных по гель-технологии  
(Gordeev et al., 2001)**

| Образцы нитей     | Абсолютная прочность (МПа) | Статический модуль (МПа) | Динамический модуль (ГПа) | Удлинение при разрыве (%) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| До ориентирования | 332                        | 3.8                      | 5.8                       | 104                       |
| Ориентированные   | 360                        | 5.6                      | 7.5                       | 37                        |





50  $\mu\text{m}$

Рис. 4.3. СЕМ снимки поверхности нитей (Yamane et al., 2001).

150°C) и применяя последующее ориентирование волокон, авторы получали более или менее кристаллические изделия и, следовательно, более или менее прочные (с абсолютной прочностью от 50 до 100 МПа). Рисунок 4.3 иллюстрирует кристаллический тип поверхности таких волокон.

Показано, что присутствие оксивалерата в ПОА, снижающее кристалличность и время кристаллизации материала, способствует более медленному и успешному ориентированию волокон (Katsuhiko, 1994). Добавление нуклеирующих агентов увеличивает скорость кристаллизации ПОБ и уменьшает время процесса (Holmes, 1984).

Есть данные о возможности получения двухкомпонентных многожильных волокон из ПОБ-со-ПОВ с капролактаном в соотношении 1:1 (по весу). При диаметре 0.31 мм разрывная прочность волокон составила 703 МПа при сохранении хорошей биоразрушаемости (Mochizuki et al., 1993). Биоразрушаемые композитные волокна также могут быть получены следующим образом, – сердцевина волокна изготавливается из ПОБ-со-ПОВ, а наружная оболочка – из полибутилсукцината или полиэтиленсукцината (температура плавления 70°C) (Yamada et al., 1995). Многожильные крученые волокна, полученные прядением из расплава ПОБ-со-ПОВ при 140-220°C и с последующим вытягиванием при 80°C в 1.2 раза в одну или две стадии, имели разрывную прочность свыше 2.0 г/d (Mochizuki et al., 1994). При содержании оксивалерата в полимере 6 мол. % и 1 части пластификатора нитрида бора и 10 частей глицеролтриацетата полученные при 180°C крученые из расплава волокна охладили до 60°C и после добавления смазки вытянули между вращающимися роликами при 100°C; в результате были получены волокна, имеющие 200 DEN/36 филаментов. Результаты, представленные в таблице 4.5, характеризуют влияние добавок пластификаторов на физико-механические свойства комплексных нитей.

Таблица 4.5

Свойства мультифиламентных волокон в зависимости от содержания в сополимере ПОб-со-ПОВ оксивалерата и пластификатора (глицеролтриацетата) (Mochizuki et al., 1994b)

| Состав полимера | вес, % | ГТА (вес. %) | Соотношение | Разрывная прочность (МПа) | Прочность (липкость) (г/d) |
|-----------------|--------|--------------|-------------|---------------------------|----------------------------|
| ПОб-со-6ПОВ     | 1      | 0            | 2.0         | 381                       | 3.6                        |
| ПОб-со-6ПОВ     | 1      | 10           | 2.8         | 444                       | 4.2                        |
| ПОб-со-6ПОВ     | 1      | 0            | 2.9         | 338                       | 3.2                        |
| ПОб-со-6ПОВ     | 1      | 10           | 3.5         | 402                       | 3.8                        |
| ПОб-со-6ПОВ     | 1      | 0            | 4.2         | 444                       | 4.2                        |

В одной из последних работ японских исследователей под руководством профессора Дои удалось существенно повысить механическую прочность монофильных волокон из ПОб с применением новой оригинальной технологии «cold-drawn» (Iwata et al., 2002). Для изготовления нитей использовали высокомолекулярный полимер (600 000 Da), синтезированный природным и рекомбинантными штаммами-продуцентами. Волокна формовали из расплава полимера в ванну с водой при температуре льда. После этого проводили двойное ориентирование; первое при температуре 0°C, второе – при комнатной. В результате волокна имели следующие характеристики: абсолютная прочность 1.4 ГПа; модуль упругости 18.1 ГПа.

#### 4.3.2. Полимерные пленки и мембраны из ПОА

В связи с хорошей растворимостью ПОА в неполярных растворителях существует возможность использования вязких полимерных растворов для изготовления пленок и мембран. Вязкие растворы полиоксибутирата и других ПОА в хлороформе обладают выраженным волокнообразующим свойством (рис. 4.4) и широко используются для получения пленочных изделий. В ряде работ описаны различные типы полимерных пленок и мембран, полученных методом полива растворов ПОА различной концентрации, от 1–5 до

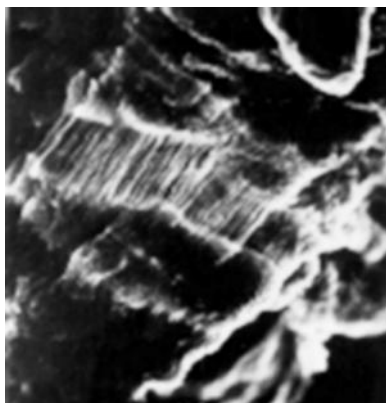


Рис. 4.4. РЭМ снимок фрагмента ПОб, увлажненного хлороформом. Видна волокнообразующая структура материала (снимок А. П. Пузыря, неопубликованные данные).

20 %. Как правило, для этого используют обезжиренную поверхность стекол. В зависимости от химического состава полимера свойства, прежде всего, пористость и, следовательно, проницаемость изделий изменяется.

С целью определения возможности изготовления пленок из ПОА изучено поведение растворов полиоксибутирата и сополимеров оксибутирата с оксивалератом различной концентрации в ряде растворителей (хлороформе, диметилформамиде, дихлорэтане и смеси хлороформа и толуола). Исследованы растворы 5, 10 и 15 % концентрации полимера (Волова с соавт., 2001; Волова с соавт., 2003). Оказалось, что из взятых систем только 15 % растворы ПОБ в хлороформе, дихлорэтане и диметилформамиде образуют связанный гель. Однако в процессе растворения ПОБ в диметилформамиде его молекулярная масса уменьшается практически в два раза. Поэтому полученные из данных растворов пленки и волокна были непрочными и разрывались при незначительных деформациях растяжения и изгиба. При использовании в качестве растворителя дихлорэтана и хлороформа изменений значения  $M_v$  полимера не отмечено, в связи с этим дальнейшие стадии процесса получения пленок и волокон (охлаждение и инклюдирование) исследовались, используя растворы ПОА различных концентраций от 5 до 15 %.

Пленки были получены методом полива из растворов ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (рис. 4.5) на поверхность обезжиренных стекол или чашек Петри. Из представленных снимков видно, что топография поверхности изученных полимерных пленок в целом сходна. Однако более эластичные пленки из менее кристаллического сополимерного материала имеют выраженную пористую и ламинарную структуру по сравнению с ПОБ.

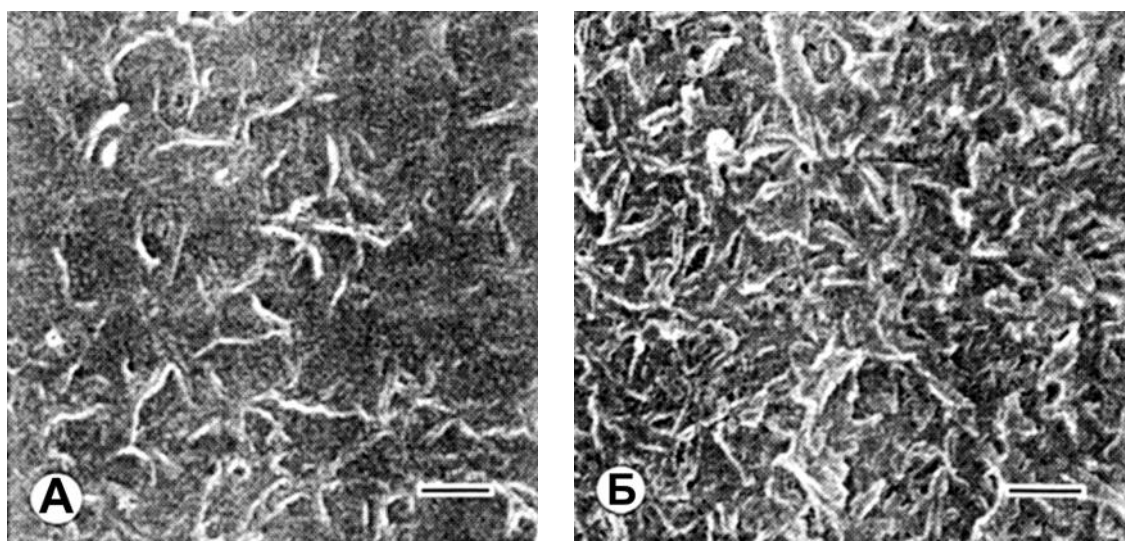


Рис. 4.5. Топография поверхности пленок: А – ПОБ, Б – ПОБ-со-ПОВ сополимер. Маркер 1 мкм. (Волова с соавт., 2001)

Свойства поверхности полимерных пленок, полученные на базе измеренных краевых углов и рассчитанные по известным уравнениям (Де Жен, 1987), представлены в таблице 4.6.

Как оказалось, химический состав материала, а именно, наличие оксидов в нем, практически не влияет на исследованные свойства поверхности пленок, включая величину контактного угла смачивания ( $\theta$ ), поверхностного натяжения ( $\gamma$ ), свободной энергии межфазовой поверхности и величину сил сцепления ( $W_{SL}$ ). Статистически достоверных различий свойств поверхностей пленок, обращенных к воздуху или стеклу, не обнаружено (Волова с соавт., 2003). По изученным характеристикам гидрофобная поверхность пленок из ПОА близка к таковым у синтетических полиэфигов (полиэтилентерефталата, полиметилметакрилата, поливинилхлорида и полиэтилена)

Структура полимерных пленок и их свойства, главным образом, свойства поверхности, могут быть модифицированы и улучшены обработкой. Особенно значимы исследования такого рода для улучшения биосовместимых свойств полимерных изделий, предназначенных для биомедицинских применений. В связи с тем, что полиоксиды активно исследуются для изготовления внутрисосудистых стентов, элементов для регенерации костных тканей (пластин, штырей, винтов и других конструкций), контактирующих с тканями *in vivo*, разработка методов и технологий для повышения их биосовместимости и улучшения механических свойств весьма актуальна.

В работе (Yang et al., 2002) исследовано влияние обработки поверхности пленок из нескольких типов полимеров на биосовместимость. Сравнивали свойства поверхности пленок, полученных поливом из растворов, из полилактида (ПЛ), полиоксибутирата (ПОБ) и сополимера оксибутирата с оксигексаноатом (ПОБ-со-ПОГ). Пленки обрабатывали раствором NaOH или липазами. Авто-

**Таблица 4.6**

**Характеристика поверхности полимерных пленок, полученных из ПОА различного состава (Волова с соавт., 2003)**

| Показатель   | Состав полимера |                         |                          |                          |
|--|-----------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | ПОБ             | ПОБ-со-ПОВ,<br>4 мол. % | ПОБ-со-ПОВ,<br>18 мол. % | ПОБ-со-ПОВ,<br>30 мол. % |
| Контактный угол смачивания ( $\theta$ , град)                                    | 67°06'          | 65°60'                  | 67°59'                   | 67°33'                   |
| Поверхностное натяжение ( $\gamma$ , эрг/см <sup>2</sup> )                       | 36,16           | 36,18                   | 34,66                    | 34,91                    |
| Свободная энергия межфазовой поверхности ( $\gamma_{SL}$ , эрг/см <sup>2</sup> ) | 6,77            | 6,35                    | 7,00                     | 6,89                     |
| Величина сил сцепления, ( $W_{SL}$ , эрг/см <sup>2</sup> ).                      | 101,19          | 102,63                  | 100,46                   | 100,82                   |

ры полагают, что в результате происходящих в ходе обработки полимеров гидролитических процессов увеличивается гидрофильность поверхности полимерных пленок и, как следствие, прикрепляемость клеток. Показано позитивное влияние обработки пленок всех типов липазами и, в еще большей степени, щелочью на адгезию и рост фибробластов мыши линии L929. При этом наилучшие результаты данного теста, практически на порядок превосходящие остальные типы пленок, зафиксированы для сополимера оксибутирата с оксигексаноатом.

Новым направлением модификации поверхности является обработка изделий физическими факторами или химическими реагентами с целью улучшения механических и биомедицинских свойств. Это делается для повышения адгезионных свойств поверхности по отношению к культивируемым животным клеткам, улучшения газодинамических свойств изделий и повышения их проницаемости для субстратов и продуктов обмена клеток. Химическая модификация включает изменение функциональных групп на поверхности полимерного материала, что повышает гидрофильность и обеспечивает лучшую прикрепляемость и лучший рост клеток. Один из подходов, применяемых для модификации поверхности изделий из ПОА, заключается в обработке газовой плазмой. При обработке, например, пленок из полиоксиоктаноата (ПОО) аммониевой плазмой в течение 10 мин. происходит включение в структуру пленки до 8 % азота (Nitschke et al., 2001). Это сопровождается значительным изменением свойств поверхности изделий; так, контактные краевые углы сокращаются на 20–30°. Поверхность становится гидрофильной, и это свойство сохраняется во времени. В ходе химической модификации поверхности полимерных пленок применяют также биологически активные и лекарственные вещества, способствующие лучшему прикреплению, росту клеток и дифференцировке формирующихся тканей. Например, при обработке газовой плазмой возможно применять активные формы биотина, аминокислоты и др. (Williams et al., 1999).

В последние годы стали появляться работы, в которых для модификации свойств ПОА начали применять лазерную обработку. В работе (Lootz et al., 2001) исследовано влияние CO<sub>2</sub>-лазера для обработки и пластификации поверхности мембран из ПОБ. Оказалось, что на поверхности мембран при лазерной обработке образуются специфические зоны различной ширины, от 10 мкм до 20–40 мкм, с измененной структурой сферолитов. Как было установлено, при засеве на такие пленки клеток фибробластов мыши L 929 лучше всего клетки адгезировали и росли именно в месте возникновения этих зон.

### 4.3.3. Микрочастицы на основе ПОА

Полиоксиполаноаты активно исследуются в качестве биодegradуемой матрицы для депонирования и контролируемой доставки лекарственных средств. Особенно перспективным считается использование ПОА для получения микрочастиц, то есть в новейшей технологии, которая называется микроинкапсулированием.

Получение микрочастиц возможно различными методами, в том числе испарением растворов полимеров. При отработке технологии варьируют соотношение носителя и лекарства, типы полимеров, молекулярный вес, скорость кристаллизации, добавки. Получаемые при этом частицы различаются формой, размерами, структурой поверхности.

Типичное изображение полимерных микросфер приведено на рисунке 4.6. Микросферы приготовлены испарением эмульсии, которая готовилась следующим образом: к водно-жировой эмульсии, содержащей раствор желатина, добавляли раствор полимера в хлороформе. Смесь перемешивали и быстро приливали к раствору винилацетата при комнатной температуре, полученную систему встряхивали в течение нескольких часов, затем высушивали. Полученные микросферы промывали дистиллированной водой и высушивали вакуумированием (Embelton and Tighe, 1992a, b). В зависимости от условий получения (температуры среды, длительности встряхивания, молекулярной массы полимера и др.) микросферы получают различного размера с различной степенью пористости и развитости поверхности.

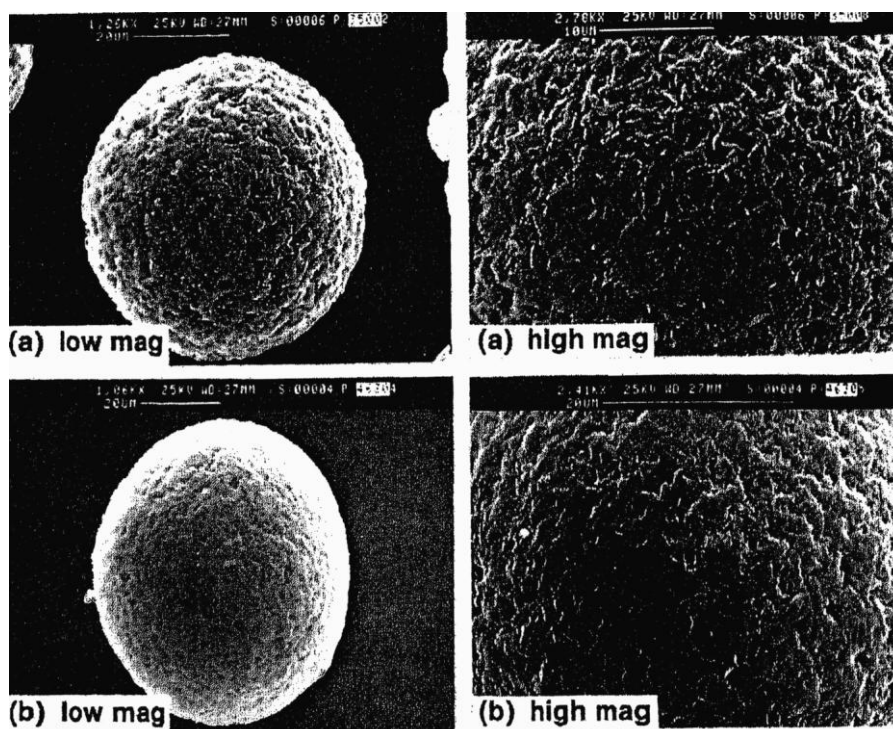


Рис. 4.6. СЕМ снимки микросфер, полученных из ПОБ различного молекулярного веса (a) 43 000, (b) 159 000 (Embelton and Tighe, 1992a)

Как видно на рис. 4.6, микросферы, приготовленные из низкомолекулярного полимера (а), имели более рыхлую структуру по сравнению с микросферами, полученными из высокомолекулярного полимера.

Наиболее часто для получения микросфер используются полиоксибутират и его сополимеры с оксивалератом (Kassab et al., 1997; Ammas et al., 1998; Gürsel et al., 2000). Установлено, что:

- с увеличением оксивалерата в ПОБ-со-ПОВ скорость высвобождения лекарства обычно замедляется, однако микрочастицы, полученные на основе ПОБ, более хрупкие по сравнению с таковыми из сополимерного материала;
- с уменьшением размера частиц снижается их нагрузочная по отношению к лекарству способность, однако скорость высвобождения препарата возрастает;
- величина молекулярной массы полимера влияет на скорость выхода лекарства незначительно;
- выход лекарств из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ происходит в результате диффузии, значительно ранее начала деградации собственно полимерного носителя;
- чем ниже содержание препарата в микрочастицах, тем ниже скорость его высвобождения.

Существуют и другие технологии для получения микрочастиц, в том числе – ультразвуковая обработка растворов ПОА. Например, в работе (Puzyr et al., 2002) использовали 0.08 % (вес/объем) раствор полиоксибутирата в хлороформе. Варьируя условия получения и концентрацию ПОБ, оказалось возможным сформировать микрочастицы диаметром от 0,3 до 2,5 мкм (рис. 4.7) методом испарения растворителя. Для этого к раствору ПОБ в соотношении 1:2 добавляли дистиллированную воду, насыщенную хлороформом и диспергировали с помощью УЗДН-1УЧ2. Для фиксации частиц в образованную в процессе диспергирования эмульсию добавляли этиловый спирт.

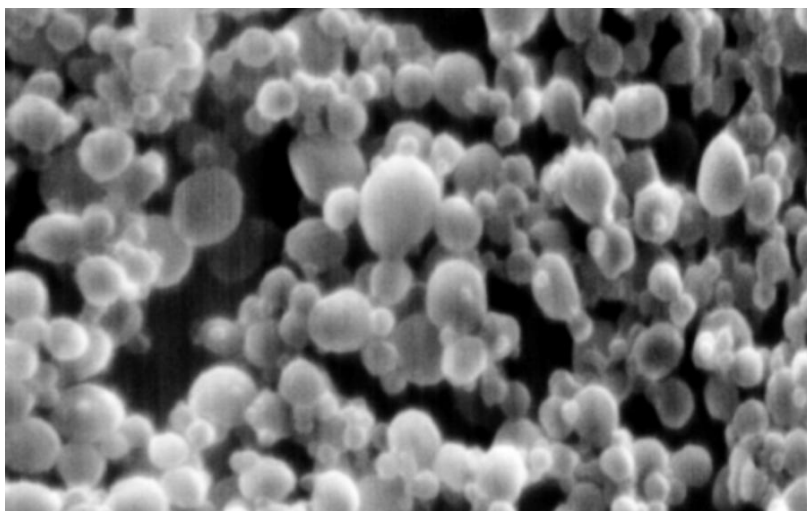


Рис. 4.7. РЭМ снимок микрочастиц полиоксибутирата (Puzyr et al., 2002)

Диаметр полученных гранул составил от 2 до 300 мкм. Статистический анализ показал, что наблюдается логарифмически-нормальное распределение частиц по размерам. Эти предварительные результаты, показавшие возможность получения однородных сферических гранул малых размеров, являются основой для дальнейшего развития работ по микроинкапсулированию.

#### 4.3.4. Нанокomпозиты

В последние годы сформировалось новое направление, связанное с получением композиционных материалов из органических полимеров и неорганических наночастиц. Гибридные материалы, содержащие органические и неорганические соединения, обладают уникальным сочетанием свойств, которые находят полезные приложения от биологии до микроэлектроники. Основы этого научного направления были созданы при разработке высокомолекулярных полимерных материалов (Папков, 1974) и фотоэмульсий с наночастицами галогенидов серебра (Джеймс, 1980).

В этой связи была предпринята попытка создания нанокomпозита на основе полиоксибутирата (Пузырь с соавт., 2001). Идея создания такого материала основана на следующем: 1) при определенных условиях полиоксибутират образует фазу геля, 2) полиоксибутират полностью разрушается в окружающей среде без образования токсичных продуктов, 3) поверхность используемых частиц состоит из гидроксильных или оксифункциональных групп. Поэтому за счет взаимного сродства полимера и частиц друг к другу можно одновременно решить проблему пассивации поверхности наночастиц полимером.

В работе был использован ПОБ с молекулярной массой 260 000 Da и степенью кристалличности 76 % (Волова с соавт., 1992). Порошки наноалмаза и оксида алюминия были получены взрывным методом. Наноалмазный порошок имел средний размер частиц порядка 4–5 нм, кубическую структуру с параметром решетки 0.356 нм, плотность кристаллов 3.1 г/см<sup>3</sup>, удельную площадь поверхности до 300 м<sup>2</sup>/г. Особенность использованного наноалмаза в том, что он содержит бор – 2.3 % массы (Ставер с соавт., 1984), причем бор предположительно находится в форме BN, который, как известно, увеличивает скорость зародышеобразования кристаллической фазы ПОБ (Withey and Hay, 1999). Порошок оксида алюминия ( $\delta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) имел удельную площадь поверхности порядка 20 м<sup>2</sup>/г и состоял из частиц сферической формы. Распределение частиц по размерам – логарифмически нормальное со следующими параметрами:  $d_{0.5} = 70$  нм, дисперсия  $\sigma = 1.9$ . Условия получения определяют стабилизацию оксида алюминия в  $\delta$  фазе. Поверхностный слой частиц (порядка 2 нм) обогащен более высокотемпературной  $\theta$  модификацией оксида, для которой характерна моноклинная структура.



Добавка порошков наноалмаза или оксида алюминия к раствору ПОВ в хлороформе с последующей обработкой ультразвуком позволила создать гомогенные, но неустойчивые суспензии. Через 5–10 мин. в таких суспензиях происходило спонтанное выпадение агрегатов наночастиц в осадок, несмотря на достаточно высокую вязкость используемого раствора полимера (14–20 масс. %). После нанесения суспензии на стеклянную подложку методом полива испарение растворителя сопровождалось агрегированием наночастиц. Это приводило к неравномерному распределению агрегатов в подсыхающем растворе полимера и впоследствии – к нарушению целостности формирующейся пленки (рис. 4.8).

Для создания устойчивого наполненного наночастицами композита полимер был исследован в состоянии геля, который обладает большей, чем у раствора, вязкостью и способен поддерживать в своем объеме взвешенные частицы как на начальных стадиях их образования, так и в процессе стабилизации геля (рис. 4.9). Раствор полиоксибутирата в хлороформе с концентрацией полимера 14 г/л переводили в гель при комнатной температуре. В полученных гелях наблюдалось явление синерезиса и уменьшение прозрачности. Появление в геле избыточного, по сравнению с раствором, светорассеяния, возможно, связано с появлением в нем локальных областей кристаллизации полимера.

Гель, содержащий наночастицы алмаза или алюминия, при нанесении на стеклянную подложку после испарения жидкой фазы образует сплошную однородную пленку с равномерным распределением наночастиц по ее площади (рис. 4.10). Стабилизация наночастиц в объеме, вероятно, происходит за счет их фиксации в сетке геля. Исходя из приведенных выше результатов, можно предположить, что полимер поли-β-гидроксимасляной кислоты может оказаться полезным компонентом для создания биodeградируемых систем с другими наночастицами. Полученный в работе нанокомпозит из частиц наноалмаза или оксида алюминия в полигидроксибутирате является первым примером нового семейства гибридных материалов из органического полимера и неорганических наночастиц.

Таким образом, в результате был синтезирован гибридный композит «биополимер – наночастицы». Найдены условия получения однородного и стабильного во времени распределения наночастиц алмаза или  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$  в объеме геля из поли-β-гидроксибутирата. Получены объемные образцы и пленки из биополимера с равномерно распределенными в них частицами наноалмаза или оксида алюминия.

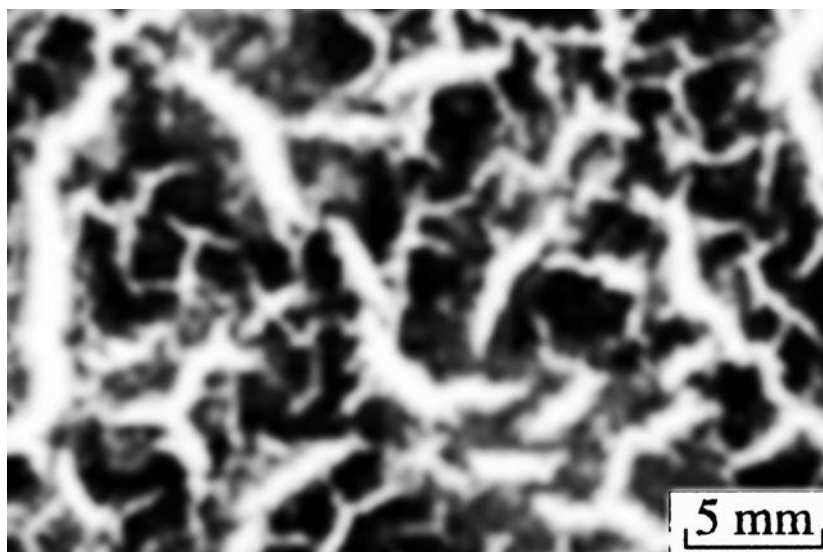


Рис. 4.8. Пленка, полученная из раствора ПОб с неравномерным распределением частиц наноалмаза (Пузырь с соавт., 2001).

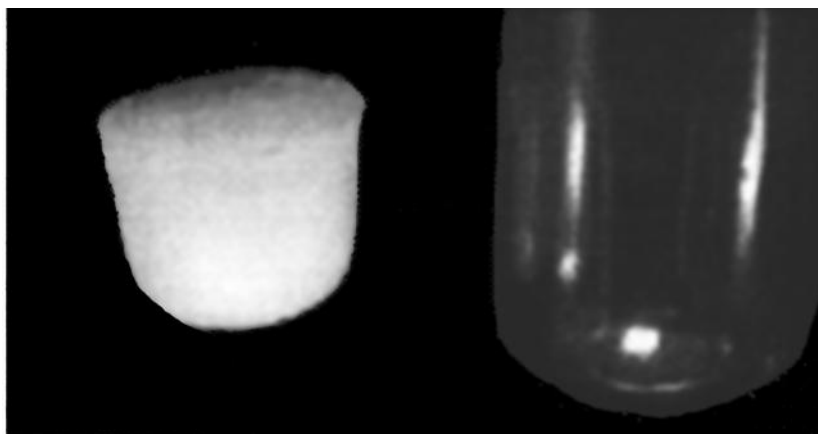


Рис. 4.9. Гибридный материал из ПОб и наночастиц оксида алюминия в состоянии геля. Справа – пробирка, в которой был получен гель (Пузырь с соавт., 2001).

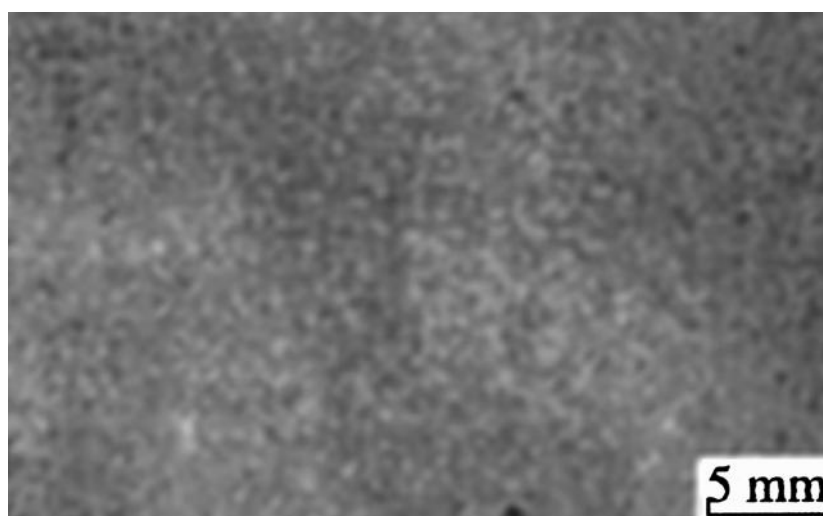


Рис. 4.10. Пленка с равномерным распределением наночастиц, полученная из геля гибридного материала «ПОб-наноалмаз» (Пузырь с соавт., 2001).

#### **4.3.5. Использование ПОА для получения пористых конструкций для тканевой инженерии**

Анализ работ в области трансплантологии и искусственных органов, появившихся к началу XXI столетия, дает основание говорить о появлении принципиально нового подхода к восстановлению функций жизненно важных органов – использование технологий генной, клеточной и тканевой инженерии. Проводимые исследования можно разделить на две группы: разработка биоискусственных (гибридных) органов и тканей, клонирование органов и тканей из собственных стволовых клеток пациента *in vitro* в специальных биореакторах.

Гибридные (биоискусственные) системы должны сочетать в себе свойства живой и неживой ткани таким образом, чтобы, при необходимости, полностью или частично, временно или постоянно заменить функции тех или иных утраченных естественных органов. Полиоксиданты в последние несколько лет стали считать наиболее перспективным материалом для изготовления матриц и пористых конструкций применительно к задачам клеточной и тканевой трансплантологии. Одной из ключевых проблем создания биоискусственных органов и тканей является разработка биodeградируемых двухмерных (пленочных) и трехмерных (губки) матриц для функционирующих клеток (Bioartificial Organs., 1997; 1999; Williams et al., 1999; Wang et al., 2001; Hu et al., 2002; 2003).

Матрицы (scaffolds) для биоискусственных органов должны обладать многофункциональностью, достаточной механической прочностью и эластичностью, биосовместимостью на белковом и клеточном уровне, способностью стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток, способностью к неоваскуляризации и возможностью стерилизации без изменения медико-технических свойств.

Как было отмечено, изделия из ПОА можно получать различными способами, в том числе из полимеров, находящихся в различных фазовых состояниях (растворы, латексы, расплавы, порошки). Это открывает пути для использования ПОА в качестве матриц для тканевой инженерии. Один из способов получения пористых матриц из ПОА – это получение двухкомпонентных смесей и последующее выщелачивание в растворе одного из компонентов, обладающего растворимостью в данной системе (Thomson et al., 1997). Альтернативой такому способу является использование техники образования волоконных структур. Обычно получают пористые микротрубочки из ПОА. Как правило, для этого к раствору или расплаву ПОА добавляют частицы хлорида натрия размером от 80 до 200 мкм в соотношении полимер:соль, как 1:2. Из смеси формируют изделия, которые потом промывают водой. В качестве подложки при формировании волоконно-подобных трубочек используют, например, тефлон (Williams et al.,

1999). Применение многокомпонентных растворных систем ПОА позволяет получать гамму пористых материалов с пористостью до 90 % при размере пор от 100 до 350 мкм (Hu et al., 2002).

На рис. 4.11 представлена микрофотография поверхности модифицированной пленки, изготовленной из полиоксбутирата с целью изучения применимости в качестве матрицы для тканевой инженерии (Nitschke et al., 2001). Пленки, полученные из раствора ПОБ в хлороформе (полимер фирмы Merck, product name Methanomer<sup>®</sup>), подвергали плазменной обработке с использованием аммония. Пленки имели толщину около 40 мкм и пористую поверхность.

Плазменная обработка вела к образованию на поверхности ПОБ amino-групп, что существенно изменяла структуру поверхности. В зависимости от длительности обработки плазмой контактные краевые углы пленок изменялись от 17 до 60°. Это, в свою очередь, влияло на смачиваемость поверхности, следовательно ее сродство к адсорбируемым клеткам. Подобный дизайн весьма перспективен для разработки конструкций, поддерживающих рост клеток тканей и органов *in vitro* для целей реконструктивной хирургии.

Большие надежды связываются с ПОА применительно к регенерации костных тканей. В последние годы все большее развитие получают исследования, направленные на разработку хирургических конструкций для регенерации и лечения поврежденных костных структур с помощью пористых биodeградируемых материалов вместо используемых металлических конструкций. Наряду с коллагеном, полилактидами и полигликолидами, изучаемыми для этих целей в настоящее время, все большее количество публикуемых работ ориентировано на полиоксиалканоаты. Показано, что различные типы ПОА, в частности, полиоксибутират и его сополимеры с оксивалератом, полиоксиоктаноатом и др., можно успешно использовать в композиции с коллагеном, полилактидами, гидроксиапатитом для получения конструкций, предназначенных для культивирования остеобластов и хондроцитов *in vitro* с последующим использованием *in vivo*.

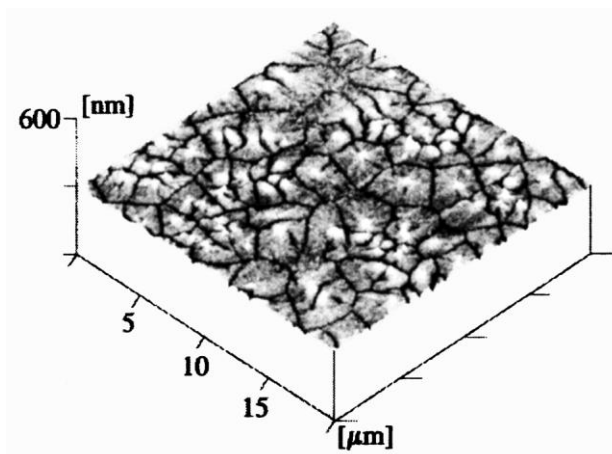


Рис. 4.11. Электронно-микроскопическое изображение пористой пленки из ПОБ (Nitschke et al., 2002).

Пленочные и объемные конструкции были получены из полиоксibuтирата и сополимеров оксibuтирата с оксигексаноатом с применением «salt leaching techniques» (Zhao et al., 2003). В ходе получения таких конструкций авторы варьировали плотность растворов полимеров, используемых для получения пленок и объемных матриц, а также соотношение компонентов в смеси «ПОБ-ПОБ-со-ПОГ». В результате были получены изделия, различающиеся структурой и свойствам, главным образом, температурными характеристиками и кристалличностью и, следовательно, различающиеся по прочности и эластичности. Наиболее удачные объемные конструкции (scaffolds), полученные из композита двух полимеров, содержащие 60 % ПОБ-со-ПОГ, испытаны в эксперименте с культивируемыми *in vitro* клетками. Использовали первичную культуру хондроцитов, которые выделяли из 3-5 дневных кроликов. Культурой клеток засеивали scaffolds и анализировали адгезию, рост клеток, формирования монослоя, а также синтез и выделение остеокальцина (рис. 4.12).

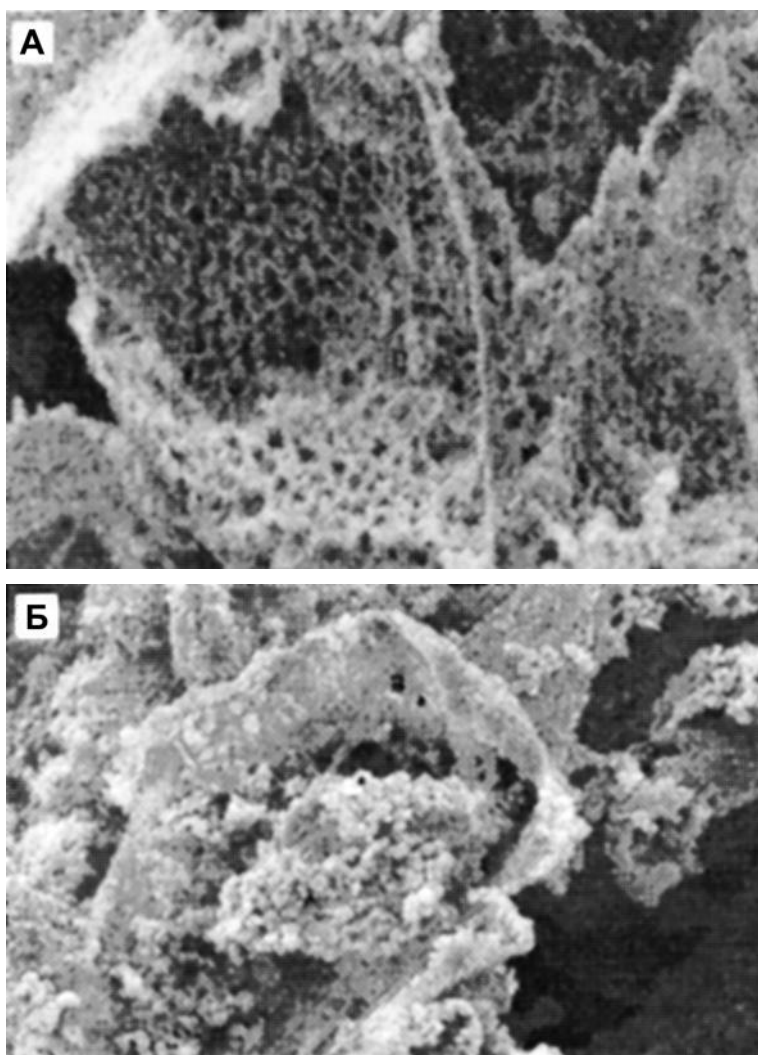


Рис. 4.12. Хондроциты, выращиваемые на матрицах из ПОБ-со-ПОГ: А – исходная матрица без клеток; Б – полимерная матрица с растущими хондроцитами. Видны сферические клетки, вросшие в полимерную матрицу из ПОБ-со-ПОГ (Zhao et al., 2003).

Клетки хондроцитов нормально росли на такой подложке и формировали костно-подобный слой, в котором соотношение кальция и фосфора соответствовало таковому в нормальной костной ткани. В следующем эксперименте подложки были имплантированы крысам линии Вистар на длительный срок. Все это время конструкции сохраняли прочностные характеристики. На сроке 26 недель отмечена выраженная деструкция полимерной матрицы, в основном, за счет аморфной фазы. В целом, продемонстрированы высокие физико-механические и медико-биологические свойства конструкции и пригодность для реконструктивной хирургии костных тканей.

В последнее время для восстановительной хирургии костных тканей достаточно широкое развитие получили работы по получению композиционных материалов и scaffolds на их основе с использованием ПОА и гидроксиапатита. Описаны успешные примеры получения пленочных и объемных конструкций ПОА с гидроксиапатитом и антибиотиками для заживления поврежденных костей, а также лечения хронических костных инфекций (Doyle et al., 1991; Lukinska and Bonfield, 1997 ; et al.).

Полиоксиалканоаты в чистом виде, а также в сочетании с полилактидами и другими материалами смешивают с трифосфатом кальция. Далее из такого композита формируются объемные или пленочные изделия, которые засеваются клетками. В зависимости от типа смешиваемых компонентов, молекулярного веса и условий формирования получают конструкции различной структуры (плотные или пористые). Стандартными термомеханическими методами получают композиты на основе трифосфата кальция и полиоксибутирата, в случае же использования композитов ПОА с хитином используют растворные технологии. Пример таких технологий успешно иллюстрируется одной из работ этого направления (Wang et al., 2001). Авторы получили биоактивные биodeградируемые композиты, используя ПОА в смеси с гидроксиапатитом и хитином в сравнении с композитами хитина с полилактидом. Анализировали структуру и свойства полученных конструкций и характер развития на их основе клеток *in vitro*. В ходе экспериментов наблюдали процесс образования костеподобных кристаллов на поверхности и внутри данных конструкций. В композите ПОА/хитин происходит образование кристаллов минерала в виде островков спустя 28 дней (рис. 4.13а, а нормальный минеральный слой образуется через 72 дня (рис. 4.13б)

В экспериментах *in vitro* показано, что включение частиц биокерамики в биоразрушающиеся полимеры позволяет получать биоактивные композиты с улучшенными свойствами, например, обладающие стимулирующим эффектом по отношению к остеобластам. Постепенная биodeградация полимерного матрикса в таких конструкциях способствует проникновению в них размножающихся клеток и

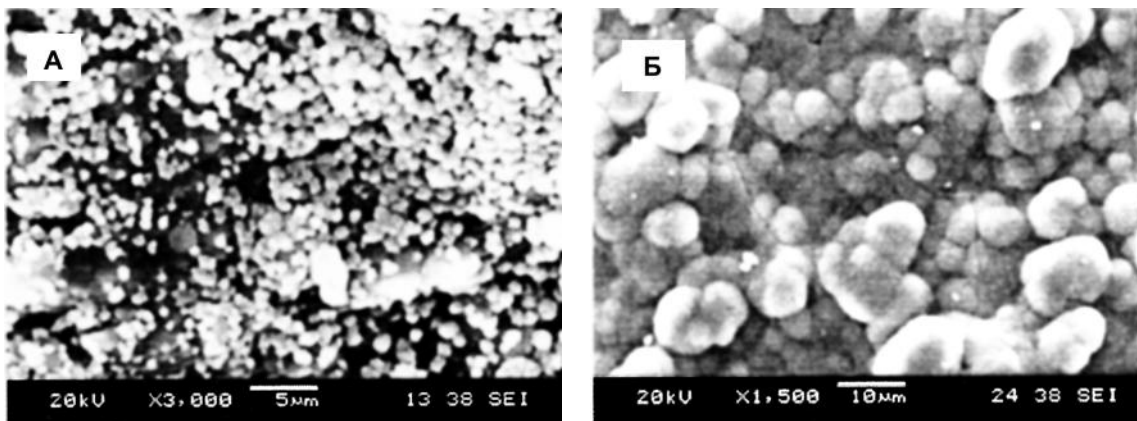


Рис. 4.13. Образование костеподобного слоя на подложке из композита «ПОА-хитин» (20 вес. % ПОА): А – 2 дня, Б – 72 дня эксперимента (Wang et al., 2001).

усиливает формирование тканей, тем самым способствует более эффективной регенерации тканей.

Таким образом, из представленных нескольких примеров видно, что, несмотря на то, что исследования ПОА применительно к задачам клеточной и тканевой инженерии находятся в стадии становления, уже сейчас просматриваются вполне реальные предпосылки для применения в этом перспективном направлении.

#### **4.4. Стерилизация изделий из полиоксисалканоатов**

Важной характеристикой материалов медицинского назначения является возможность применения для их стерилизации общепринятых методов, т. е. сохранение устойчивости при воздействии повышенных температур и др. стерилизующих агентов.

Термопластичность и радиационная устойчивость ПОА позволяют использовать для их стерилизации различные методы. Однако имеющиеся результаты по устойчивости ПОА-изделий к методам стерилизации фрагментарны и неоднозначны. Так, в работе (Lootz et al., 1997) показано, что при обработке экспериментальных изделий из ПОБ окисью этилена, парами формалина и автоклавированием не происходит деградации (разложения) материала, а также изменений молекулярного веса и прочности изделий, однако при стерилизации  $\gamma$ -источником (доза 40 kGy) было отмечено значительное падение величины  $M_v$  и снижение твердости изделий. Авторы другой работы (Miller and Williams, 1987) наблюдали резкое снижение прочностных свойств монофильных ПОБ- и ПОБ-со-ПОВ-нитей при облучении  $\gamma$ -источником дозой существенно меньшей, 10 kGy, в то время, как меньшие дозы (2.5 и 5.0 Мрад) практически не влияли на структуру и прочностные показатели.

С целью определения устойчивости полимерных пленок к воздействию стерилизующих агентов исследовано влияние термических и химических методов стерилизации на физико-механические свойства (Шишацкая с соавт., 2001). Пленки стерилизовали термообработкой (в сухожарочном шкафу в течение 24 ч. при 120° и 140°С, автоклавированием при 120°С в течение 45 мин. (1.1 атм), облучением  $\gamma$ -источником (доза 2.5 Мрад) и выдерживанием в дезинфицирующих растворах (96 % этанол (24 ч.) и 6 % перекиси водорода (6 ч.) (рис. 4.14).

Существенных различий влияния способа стерилизации на величину молекулярной массы полимерного материала не выявлено, однако прочностные свойства пленок из ПОБ после автоклавирования и суховоздушной термообработки при 140°С несколько ухудшались. Пленки, изготовленные из ПОБ, при этом становились хрупкими. Отмечено некоторое (менее 20 %) снижение прочности. Негативного влияния исследованных способов стерилизации на аналогичные свойства пленок, изготовленных из ПОБ-со-ПОВ, не обнаружено. Результаты изучения влияния стерилизации на свойства поверхности полимерных пленок представлены в таблице 4.7.

Шовные нити, изготовленные из двух типов ПОА, стерилизовали паровым способом (автоклавированием в течение 45 мин. при 120 (1.1 атм) и 130°С (2.0 атм) и  $\gamma$ -облучением (доза 2.5 Мрад). Оба метода практически не влияли на прочностные свойства нитей, изготовленных из ПОБ-со-ПОВ. Зарегистрированные незначительные изменения показателей прочности ПОБ-нитей (абсолютная разрывная нагрузка и модуль упругости) в пределах 10 % от исходных значений находятся в пределах точности применяемых методов измерений (таблица 4.9). Отметим, что Европейская Фармакопея допускает падение прочности хирургических нитей после стерилизации на 25 %.

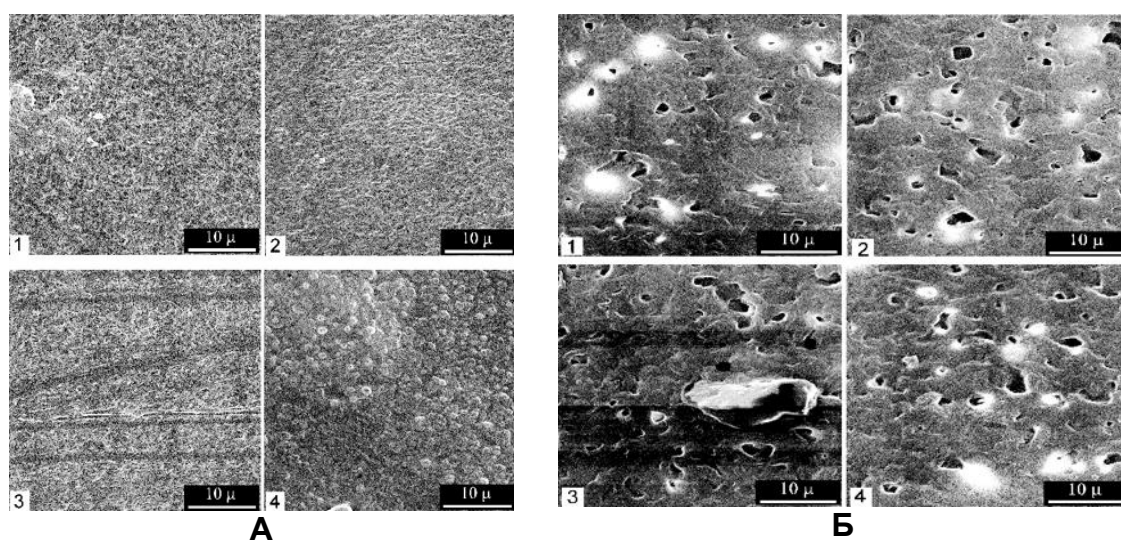


Рис. 4.14. Топография поверхности пленок, изготовленных из ПОБ (А) и ПОБ-со-ПОВ (Б): 1 – исходная, 2 – обработка этанолом, 3 – сухожаровая стерилизация, 4 – автоклавирование (Шишацкая с соавт., 2001).



**Таблица 4.7**

**Влияние метода стерилизации на свойства полимерных пленок  
(Волова с соавт., 2003)**

| Метод стерилизации                  | ПОБ         |                               | ПОБ-со-ПОВ  |                               |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|
|                                     | $M_w$ , кДа | Прочность, кг/мм <sup>2</sup> | $M_w$ , кДа | Прочность, кг/мм <sup>2</sup> |
| без обработки (контроль)            | 340 ± 25    | 3.8 ± 0.6                     | 260 ± 19    | 4.0 ± 0.3                     |
| 120°C, 24 ч.                        | 330 ± 19    | 3.6 ± 0.3                     | 258 ± 22    | 4.2 ± 0.2                     |
| 140°C, 24 ч.                        | 300 ± 21    | 3.4 ± 0.4                     | 240 ± 15    | 4.2 ± 0.4                     |
| γ-облучение (2.5 Мрад)              | 342 ± 21    | 3.7 ± 0.3                     | 264 ± 20    | 4.0 ± 0.2                     |
| Автоклавирование (1.1 атм)          | 306 ± 28    | 3.2 ± 0.5                     | 250 ± 31    | 4.1 ± 0.5                     |
| Этанол, 96 %                        | 340 ± 19    | 3.8 ± 0.2                     | 265 ± 23    | 4.1 ± 0.3                     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 6 % | 329 ± 23    | 3.7 ± 0.24                    | 259 ± 22    | 4.0 ± 0.2                     |

**Таблица 4.9**

**Влияние метода стерилизации на прочностные свойства полимерных нитей  
(Волова с соавт., 2003)**

| Метод стерилизации         | ПОБ-со-ПОВ                       |                            | ПОБ                              |                            |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|                            | Абсолютная разрывная нагрузка, Н | Прочность при разрыве, МПа | Абсолютная разрывная нагрузка, Н | Прочность при разрыве, МПа |
| Без обработки (контроль)   | 9.40 ± 0.19                      | 274 ± 27                   | 7.10 ± 0.21                      | 205 ± 31                   |
| Автоклавирование (1.1 атм) | 9.41 ± 0.17                      | 262 ± 22                   | 7.21 ± 0.22                      | 195 ± 12                   |
| Автоклавирование (2.0 атм) | 9.39 ± 0.24                      | 286 ± 19                   | 7.49 ± 15                        | 182 ± 14                   |
| γ-облучение (2.5 Мрад)     | 8.95 ± 0.19                      | 269 ± 21                   | 7.00 ± 0.31                      | 179 ± 21                   |

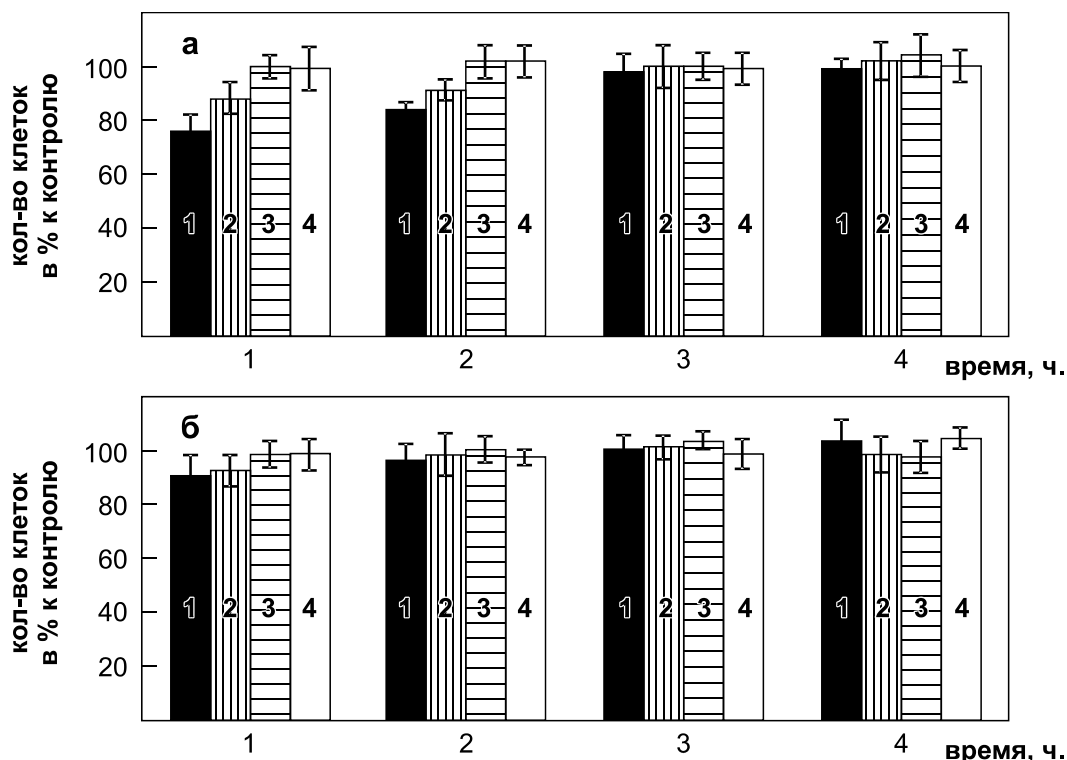


Рис. 4.15. Влияние способа стерилизации на адгезию фибробластов мыши линии NIH 3T3 на поверхности пленок ПОБ (а) и ПОБ-со-ПОВ (б) после стерилизации суховоздушной обработкой при 140°C (1), автоклавированием (2),  $\gamma$ -облучением 2.5 Мрад (3) и спиртом (4). Контроль – стекло. По вертикали – среднее количество клеток в поле зрения (в % относительно контроля) (Шишацкая Е.И. с соавт., 2001).

Результаты исследования адгезии фибробластов мыши линии NIH 3T3 на поверхности полимерных пленок после стерилизации относительно контроля (стекло) представлены на рис. 4.15. Фибробласты культивировали в течение 4 часов в среде с 10 % ЭТС в прямом контакте с обработанными полимерными пленками. Следует отметить, что, независимо от способа стерилизации, вследствие низкой смачиваемости, пленки перед посевом клеток необходимо выдерживать не менее 2 часов в дистиллированной воде, так как на гидрофобной поверхности клетки плохо адгезируют. После стерилизации сухим жаром в течение двух часов и спиртовой обработки (с последующим выдерживанием образцов в стерильной деионизированной воде) количество клеток, прикрепленных на поверхности полимерных пленок, через 4 часа сопоставимо с контролем, хотя в первые два часа их было значительно меньше (рис. 4.15а). Аналогичные результаты получены в ходе исследования пленок из ПОБ-со-ПОВ (рис. 4.15б). Таким образом, стерилизованные ПОА-пленки обладают хорошими адгезионными свойствами по отношению к культивируемым фибробластам мыши.

Тем самым установлена возможность стерилизации пленок и нитей из полиоксиканоатов общепринятыми методами и показано, что их прочностные свойства не ухудшаются в процессе термообработки, а также после  $\gamma$ -облучения.

## **Глава 5. БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ**

Способность полиоксиалканоатов разрушаться до конечных продуктов (аэробно, до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ) в различных биологических средах является одним из наиболее ценных их свойств (Jendrossek et al., 1990; Brandl et al., 1990; Abe et al., 1995; 1998; 2000; Abe, Doi, 1996; 1999; Doi, Abe, 1997; Jendrossek, 2001).

Полиоксиалканоаты могут разрушаться не только под воздействием температуры, но в результате кислотного и щелочного гидролиза, а также под биологическим путем, под воздействием ферментов – деполимераз. При термальном разложении происходит случайное разделение полимера (Grassie and Murray, 1984). Под влиянием кислот или щелочей полиоксиалканоаты разлагаются, как обычные эфиры. Гидролиз ПОБ сильной кислотой (например, 3N HCl) при  $104.5^\circ$  показал, что кислота атакует эфирные соединения кристаллизованной оболочки, но не кристаллизованного ядра ПОБ гранул. (Yu et al., 2000). В разбавленных растворах процесс химического гидролиза полиоксиалканоатов протекает крайне медленно, но увеличивается при высоких температурах (Mergaert, 1993). Биологическая деградация ПОА происходит гидролитически под воздействием специфических ферментов-деполимераз, продуцируемых микроорганизмами, а также ферментами крови и тканей высших животных (Doi et al., 1992 a,b; Gogolewski et al. , 1993a, b; Abe and Doi, 1996; Abe et al., 1998;).

### **5.1. Биodeградация ПОА в модельных и природных средах**

Наиболее изучаемым аспектом биodeградации ПОА является способность микроорганизмов использовать данные полимеры в качестве субстрата для роста. Микроорганизмы разрушают ПОА внутри клеток эндодеполимеразами и внеклеточно – под воздействием внеклеточных деполимераз (Jendrossek et al., 1996). Микробные ПОА-деполимеразы относят к сериновым эстеразам (Brucato, Wong, 1991; Müller, Jendrosek, 1993).

Внутриклеточные деполимеразы ПОА не гидролизуют полукристаллические полиоксиалканоаты, выделенные из биомассы, а внеклеточные деполимеразы не обладают субстратной специфичностью по отношению к полимеру, ассоциированному в гранулах внутри клеток. Это связано с различным фазовым состоянием и различиями в

структуре внутриклеточного «нативного» и внеклеточного «денатурированного» из гранул полимера (Jendrossek et al., 1996).

При внеклеточной деградации полимера продукт гидролиза поглощается микроорганизмами, утилизируется в виде разложенных на составные части соединений в качестве источников питания. Экзодеполимеразы многих бактерий, а также грибов выделены в чистом виде и охарактеризованы. К их общим свойствам следует отнести следующее: а) стабильность при изменяющихся условиях pH, температуры и ионной силы среды; б) относительно низкую молекулярную массу (менее 100 кДа); в) большинство деполимераз состоит только из одного полипептида; г) ПОА-деполимеразы не связываются с анионами таких веществ как ДЕАЕ (нейтральная pH), но близки по свойствам к гидрофобным материалам; д) оптимум pH для них составляет 7.5-9.8, (исключение составляют экзодеполимеразы *P. pickettii* и *P. funiculosum*, имеющие оптимум pH, соответственно, 5.5 и 6.0) большинство РНА деполимераз подавляются ингибиторами сериновых гидролаз, такими как диизопропилфлуорофосфат или ацилсульфаниловыми соединениями, которые ковалентно связываются с активным участком серина у сериновых гидролаз (Jendrossek et al., 1996).

Показано, что процесс энзиматической деградации пленок из ПОБ на 2–3 порядка выше, чем обычная небиологическая гидролитическая деградация в водных средах (Kumagai, 1992a, b). Факторами, наиболее воздействующими на биоразрушаемость, являются стереоконфигурация, степень кристалличности и молекулярная масса данных полимеров, а также химический состав (Kanewasa et al., 1994; Abe et al., 1998). Установлено, что между длиной углеродной цепи ПОА и ее разрушением существует прямая связь (Quinteros et al., 1999). При изучении пленочных образцов было показано, что ПОА-экзодеполимераза в первую очередь гидролизует полимерные цепи в аморфной фазе и только после этого затрагивает упорядоченные зоны (Organ, Barham, 1988; Doi et al., 1989b; 1992a; Hocking et al., 1996). В целом процесс энзиматической деградации полимера в аморфном состоянии примерно в 20 раз превышает деградацию цепей кристаллического строения (Abe et al., 1995).

Сотрудники под руководством профессора Дои, проводящие широкие исследования в области биосинтеза и изучения структуры и свойств различных по составу ПОА, предположили, что ферментный гидролиз полиоксиалканоатов имеет двухступенчатый характер. Сначала происходит адсорбция деполимеразы на полимере и далее начинается его гидролиз (Doi et al., 1994; Kasuya et al., 1995).

Продуктами, образуемыми в ходе энзиматической деполимеризации ПОА, могут быть мономеры (например, у *Comamonas sp.*, *A. eutrophus*), димеры (*P. fluorescens*) или смесь олигомеров, от мономеров до тримеров (*A. faecalis* и *P. lemoignei*). Олигомеры затем

разрушаются до мономеров олигомерными гидролазами (Abe et al., 1999; Jendrossek et al., 1996; Shirahura et al., 1986)

Возможны два места энзиматической атаки фермента при взаимодействии с упорядоченной фазой ПОА. В первом случае размер кристалла уменьшается от грани по направлению к центру. Фермент последовательно деградирует индивидуальные цепи вдоль гранул кристалла, начиная от доступного конца цепи (Urmeneta et al., 1995; Yu et al., 2000). В другом случае деградация цепей основана на разделении цепи. Вначале атака инициирует складки цепей и затем продолжается перпендикулярно ламелярному слою до тех пор пока не достигнет плотного ламелярного центра, после этого процесс останавливается. Существует мнение, что отдельные кристаллы атакуются от конца кристалла предпочтительнее, чем от складки поверхности (Urmeneta et al., 1995).

Бактериальная деградация различных типов полиоксиалканоатов *Comamonas sp.*, *Pseudomonas lemoignei* и *Pseudomonas fluorescens* GK 13 показала, что процесс гидролиза зависит от поверхностного слоя, где полимер подвергается действию бактериальных ферментов. Сканирующей микроскопией частично разрушенных образцов выявлено, что гидролиз начинается на поверхности, потом повреждение полимера продолжается частично и внутрь. Для не деградируемых полиоксиалканоатов этого не наблюдается (Molitoris et al., 1996; Yu et al., 2000). Так, (Doi and Iwata, 1992; Iwata et al., 1999) изучена деградация отдельных кристаллов сополимеров 3-оксибутирата с различными оксикислотами деполимеразой, выделенной из *Alcaligenes faecalis* T1. Энзиматическая деградация отдельных кристаллов продвигалась от края и конца кристалла до раскалывания на небольшие кристаллические фрагменты. Ламелярный слой отдельных кристаллов и молекулярный вес цепей сополимеров оставались при этом без изменений в течение энзиматического гидролиза. Полученные результаты подтверждают гипотезу, по которой гидрофобная адсорбция фермента способствует увеличению подвижности молекулярных цепей отдельных кристаллов и производит расстройство в области упаковки цепей. Активный участок ПОБ деполимеразы беспорядочно связывается с областью упаковки цепей краев и концов кристалла (Iwata et al., 1999). Энзиматическая деградация ПОА имеет ограничения вследствие затруднений, возникающих при диффузии гидрофильного фермента в гидрофобный полимер (Wu et al., 1998).

В литературе встречаются немногочисленные примеры изучения биodeградации ПОА. Так, изучены динамика разрушения сополимеров оксибутирата и оксивалерата, с различной величиной включения последнего (Madden et al., 1998) и установлено, что сополимерные образцы разрушаются быстрее. Стереоизомеры различных

структурных вариаций ПОА, полученные в различных режимах биосинтеза и химического синтеза, исследованы в работе (Abe et al., 1994). Биосинтетический полимер был взят из *A. eutrophus* и синтезирован химически из бутуролактона в присутствии различных катализаторов. Установлено, что добавлением атактического синтетического ПОБ можно изменять температурные характеристики и степень кристалличности материала в широком интервале, что значительно влияет на скорость разрушения. Среди водорастворимых продуктов гидролиза бактериального полимера обнаружена смесь димеров и мономеров, смесей [RS]-полимеров – смесь мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров.

Выявлено, что морфология надмолекулярной структуры ПОА влияет на его биодegradацию (Canetti et al., 1999. Авторами исследованы пленки, полученные из расплава полимера при различных температурах, деградируемые экзодеполимеразой *Aureobacterium saperae*. Увеличение степени кристалличности и размеров кристаллов приводило к уменьшению скорости деградации полимера. Отрицательное влияние увеличения степени кристалличности ПОА на скорость их биодеструкции отмечено также в работе (Kusaka, Doi, 1999). Авторами изучена разрушаемость высокомолекулярного полиоксибутирата, синтезированного рекомбинантным штаммом *E. coli*, трансформированного генами *Ralstonia eutropha*, под воздействием деполимеразы *Al. faecalis*. Выявлено существенное влияние на скорость деградации степени кристалличности материала и температуры среды и практическое отсутствие влияния на процесс величины молекулярной массы ПОА.

В модельных лабораторных системах (почве, почвенных вытяжках и воде) исследована кинетика разрушения пленок, изготовленных из ПОБ и сополимеров оксибутирата и оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ) с различными исходными свойствами (таблица 5.1) (Волова с соавт., 1992а; 1996; 1998).

Таблица 5.1

**Свойства ПОА, использованных для получения пленок и изучения биодegradации**

| № п/п образца | Соотношение З(ПОБ-со-ПОВ) (мол. %) | $M_e$ (Da) | $T_{пл}$ (°C) | Кристалличность $C_x$ (%) |
|---------------|------------------------------------|------------|---------------|---------------------------|
| 1             | 100                                | 0          | 179           | 70                        |
| 2             | 100                                | 0          | 178           | 67                        |
| 3             | 100                                | 0          | 182           | 72                        |
| 4             | 90                                 | 10         | 168           | 55                        |
| 5             | 85                                 | 15         | 160           | 53                        |
| 6             | 70                                 | 30         | 143           | не определено             |

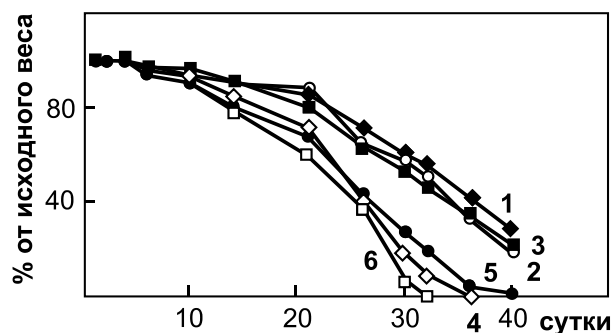


Рис. 5.1. Динамика уменьшения массы пленок различных образцов ПОА, в ходе их разрушения в почве. 1–3 – ПОБ, 4–6 – ПОБ-со-ПОВ. Характеристика образцов в таблице 5.1 (Волова с соавт., 1996)

Результаты разрушения в почве пленок, изготовленных из различных образцов полимеров и отличающихся исходными значениями кристалличности, температуры плавления и средневесового молекулярного веса (таблица 5.1), представлены на рис. 5.1 и 5.2.

Образцы гомогенного ПОБ с близкими значениями степени кристалличности и температуры плавления, но существенно различным молекулярным весом разрушались в почве с практически равными скоростями. Скорость деградации ПОБ-со-ПОВ выше, чем ПОБ.

В течение первых 5–7 сут. масса пленок оставалась неизменной; в последующие 5–10 сут. наблюдали снижение веса пленок при средней скорости деградации 0.20–0.27 мг/сут. Далее наступала фаза интенсивной деструкции, в ходе которой скорость деградации возрастала до 0.50–0.67 мг/сут. Вероятно, требуется некоторый временной период для адаптации микроорганизмов к полимерному материалу как субстрату и синтеза деполимеризующих ферментов, вызывающих деструкцию и последующую утилизацию полимерного материала микробными клетками. При этом также могла иметь место стадийность разрушения, когда на первом этапе происходит разрыв полимерной цепи, а на втором – утилизация материала микроорганизмами при снижении его молекулярного веса и убыли общей массы.

При использовании в качестве модельной среды водопроводной воды, содержащей  $1.4 \times 10^5$  клеток/мл аэробной микрофлоры, разрушаемость пленок толщиной 0.07 мм была сравнима с разрушением в данных условиях писчей бумаги. В течение 40 сут. при комнатной температуре (18–20°C) зафиксировано снижение веса пленок из

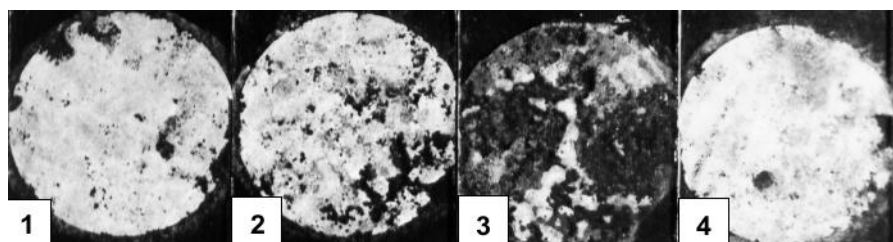


Рис. 5.2. Внешний вид пленок ПОА после пребывания в почве. 1 – ПОБ, толщина 0.05 мм, 10 сут.; 2 – то же, 20 сут.; 3 – ПОБ-со-ПОВ, 0.05 мм, 20 сут.; 4 – ПОБ-, 0.07 мм, 20 сут. (Волова с соавт., 1992а).

ПОБ на 56, ПОБ-со-ПОВ – на 70, бумаги – на 62% от исходных величин.

Разрушение пленок исследовано при различных значениях pH и температуры среды в почвенной болтушке, приготовленной на основе цитратно-фосфатного буфера с соотношением почва:буфер = 1:10 (по весу) (зимогенный титр  $1.3 \times 10^7$ ). Для сравнения использованы пленки из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, содержащего 80 и 20 мол. % оксибутирата и оксивалерата соответственно. Выявлено существенное влияние температуры среды на скорость биodeградации полиоксиалканоатов. При 16–18° в среднем скорость деградации пленок была в 2.0–2.5 раза ниже, чем при 20°; при 26–28° деградация была интенсивнее практически в 2.0–2.5 раза и без выраженной лаг-фазы. Однако при повышении температуры свыше 35° процесс разрушения пленок несколько замедлялся. Вероятно, данная температура ингибировала развитие мезофильной почвенной микрофлоры. Влияния активной реакции среды в изученном диапазоне на скорость разрушения ПОА не зафиксировано.

Скорость разрушения сополимерных пленок в почвенной болтушке, аналогично почве и воде, была выше по сравнению с гомогенным ПОБ. В сополимерах, имеющих более низкие значения всех показателей ( $T_{пл}$ ,  $C_x$  и  $M_e$ ), по мере увеличения доли оксивалерата, происходит выравнивание соотношения упорядоченной и неупорядоченной фаз, то есть доля аморфной фазы по сравнению с более кристаллическим ПОБ возрастает. Степень кристалличности является наиболее существенным из рассмотренных свойств ПОА, оказывающим влияние на разрушаемость биополимеров.

Таким образом, скорость биodeградации полиоксиалканоатов, помимо температуры среды, существенно зависит от их химического состава. Наличие в составе ПОА в качестве сополимера оксивалерата, оказывая влияние на степень кристалличности материала, ускоряет его деструкцию под воздействием типичной микрофлоры почвы и воды.

С ростом перспектив применения ПОА все большую актуальность приобретает исследование закономерностей разрушаемости ПОА в естественных природных условиях. Тем более, что результаты по разрушаемости ПОА, полученные в модельных лабораторных условиях с использованием чистых микробных культур, выделенных из природных источников, а также под воздействием деполимеризующих ферментов не позволяют предвидеть картину разрушения данного биополимера в природной среде, в многокомпонентных и разнообразных естественных экосистемах.

В естественных природных условиях ПОА разрушаются до конечных продуктов – диоксида углерода и воды, причем процесс происходит довольно быстро. Так, описана полная деградация пленок



за три недели в свежей речной воде при температуре 25° (Kusaka, Doi 1999). Разрушение полиоксибутирата и сополимера ПОБ-со-ПОВ (с 10 мол. % валерата) изучено при различной температуре (от 15 до 40°C) в почве (Mergaert et al., 1993). Установлено, что скорость деградации (измеряемая по изменению массы образцов пленок) варьирует от 0.03 до 0.64 % в день в зависимости от типа почвы, химического состава ПОА и температуры. В основном, с увеличением температуры скорость деструкции возрастала, при этом у гетерополимерных пленок она была выше. Процесс разрушения полимеров сильно зависит от их композиции. Так, например, сравнение разрушения полиоксибутирата и его сополимеров бактериями *Alcaligenes faecalis* показало, что степень эрозии уменьшается в следующем порядке: П(ЗОБ-со-4ОБ) > П(ЗОБ) > П(ЗОБ-со-3ОВ) (Doi et al., 1992a, b; Mukai et al., 1992). Doi изучал биodeградацию микробных сополимеров 3-окисбутирата с 3-оксивалератом П(ЗОБ-со-3ОВ) и 3-оксибутирата с 4-оксибутиратом П(ЗОБ-со-4ОБ) в морской воде. Процесс деградации существенно зависел от температуры воды. В ходе деградации пленок на фоне уменьшения массы также снижались прочностные свойства пленок (Doi et al., 1992b).

Динамика разрушения полиоксиалканоатов исследована в реальных природных условиях в лесном пруду Бугач в окрестностях г. Красноярска. Разрушение пленок из ПОА, помещенных в сетчатые полиэтиленовые ловушки и размещенные на глубине 1 м, исследовали в течение нескольких полевых сезонов. Одновременно анализировали состояние экосистемы пруда; определяли сезонную динамику фито- и бактериопланктона, содержание кислорода и температуру воды. На рисунке 5.3 в качестве примера показана одна из кривых, отражающих изменение массы полимерных пленок, экспонированных в пруду.

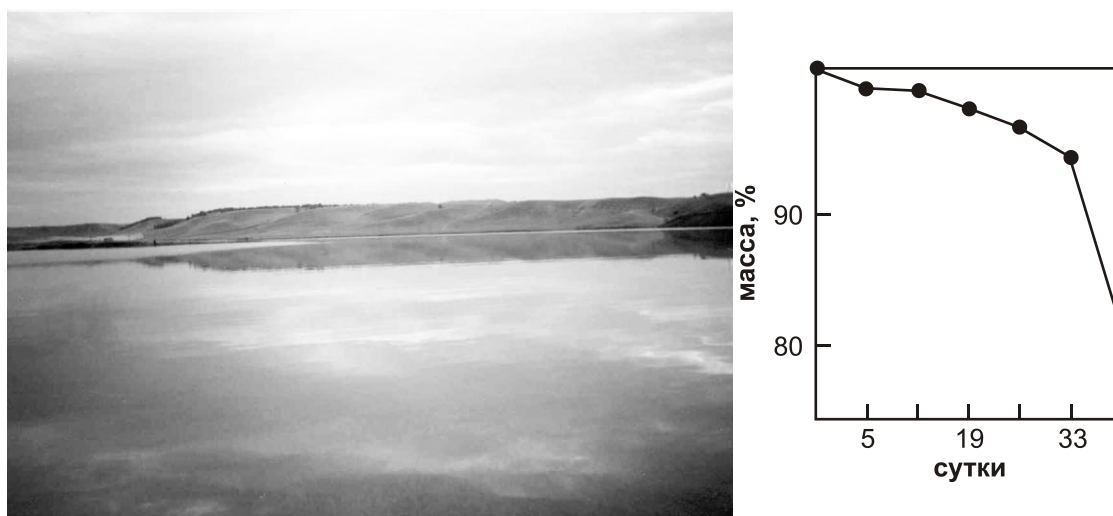


Рис. 5.3. Пруд Бугач, лето 2001 г. (фото М. И. Гладышева). Справа – динамика убыли массы пленок из ПОБ-со-ПОВ (Волова, неопубликованные данные).

На кинетику разрушения ПОА оказывали влияние температура среды, а также состояние экосистемы водоема, определяемое соотношением ее звеньев, в первую очередь, фитопланктона и выраженность «цветения». Тем не менее, аналогично лабораторным экспериментам с почвой и водой, разрушение ПОБ происходило медленнее по сравнению с образцами ПОБ-со-ПОВ (неопубликованные данные Воловой Т. Г.).

При сопоставлении результатов по разрушению полиоксиалканатов в лабораторных и природных условиях выявлено, что скорость деградации полимерных пленок в лесном пруду на 20–30 % выше по сравнению с разрушением образцов ПОБ и ПОБ-со-ПОВ аналогичного происхождения, состава и свойств при близких значениях температуры среды (20–25°C) в лабораторных модельных водных системах. Это увеличение скорости разрушения, очевидно, связано со свойствами динамичной природной экосистемы (Сергеева, 2000).

Таким образом, процессы деградации ПОА в природных средах и участие в них ПОА-экзодеполимераз исследуется (Kumagai and Doi, 1992a,b; Kumagai et al., 1992; Spyros et al., 1997; Cao et al., 1999). Однако имеющиеся данные по влиянию состава полимеров на скорость их разрушения противоречивы. В одних работах показано, что наиболее быстро разрушаемыми являются сополимеры ЗПОБ-со-4ПОБ по сравнению с гомогенным полиоксибутиратом и сополимерами ЗПОБ-со-3ПОВ (Doi et al., 1992a); в других показано, что скорость разрушения сополимеров ЗПОБ-со-3ПОВ выше по сравнению с ПОБ, а также ЗПОБ-со-4ПОБ (Kanewasa et al., 1994; Abe and Doi, 1999).

## **5.2. Биodeградация ПОА в биологических средах *in vitro***

На сегодняшний день мало изученным остается вопрос о механизме и кинетике биodeградации ПОА в биологических средах. Вместе с тем, эти вопросы являются очень важными для применения саморазрушающихся материалов и изделий в медицине (Пхакадзе, 1990; Розанова, 1999; Amass et al., 1998 и др.).

Саморазрушающиеся медицинские материалы и изделия должны быть не только абсолютно безвредными для организма, а также иметь необходимые механо-физические характеристики. При этом скорость биодеструкции материала должна соответствовать скорости регенеративных процессов в тканях. Поэтому важнейшим моментом для применения биодеструктивных имплантатов является знание механизма и кинетики биодеструкции конкретного материала в конкретных условиях внутренней среды организма. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные по биодеструкции ПОА в биологических средах весьма противоречивы. В одних работах пока-

зано, что имплантированные животным мононити, полученные из ПОВ и ПОВ-со-ПОВ, не изменяли массы и сохраняли механико-физические свойства в течение длительного, до 6–12 месяцев, времени (Miller and Williams. 1987). В других работах зафиксировано, что в течение года масса пленочных образцов ПОА и иных конструкций может уменьшиться от 30 до 80 % от исходной (Duvernoy et al., 1995; Lukinska et al., 1997).

С целью выявления механизма деградации полиоксиалканоатов исследуется их стабильность в модельных системах *in vitro* при различных значениях pH и температуры среды, солёности, а также в других условиях. Используют для этого полимеры различного химического состава, имеющие разные исходные значения молекулярной массы и кристалличности, а также полимерные изделия (пленки, нити) различной формы и структуры (степень пористости, свойства поверхности). Как правило, показателями деструкции ПОА и изделий из них служат: уменьшение молекулярной массы и степени кристалличности полимера, а также собственно изменение общего веса полимерных изделий и их прочностных свойств.

В одной из ранних работ по гидролитической деградации ПОА (Doi et al., 1992) исследованы полимерные пленки из ПОВ и сополимеров (ЗПОБ/ЗПОВ и ЗПОБ/4ПОБ), при экспозиции их в фосфатном буфере (pH 7.4) при 37 и 70°C. В течение 200 сут. не отмечено уменьшения массы всех типов пленок, однако молекулярный вес материала уменьшался; особенно значительно – сополимеров ЗПОБ-со-4ПОБ (при 70°C – практически наполовину от исходного значения). Сопоставление скорости гидролитической деструкции пленок, изготовленных из ПОВ и смесей полиоксибутирата с тетраметилцеллюлозой (ТМЦ) при экспонировании в фосфатном буфере (pH 7.0 и 37°C) показало, что масса пленок из ПОВ практически не изменялась, в то время как композитные пленки деградировали. На снижение величины  $M_w$  влияло содержание ТМЦ и длительность эксперимента. В течение 100 сут.  $M_w$  материала композитных пленок «ПОБ-ТМЦ» (содержание последней 30 мол. %) снизилась примерно на 30 %; параллельно отмечено падение модуля Юнга и прочности на разрыв (Lootz et al., 1998). Недавно подтверждено отсутствие химического гидролиза поли-3-оксибутирата в небиологических средах (Martin et al., 1999). В течение 10 недель при pH 7.4 отмечено крайне незначительное изменение молекулярной массы полимера без снижения общего веса.

Детальное исследование динамики прочностных свойств монофильных нитей из ПОВ и сополимеров ПОВ-со-ПОВ выполнено Н. Миллером в соавторстве с Д. Виллиамсом (Miller, Williams, 1987). Авторы показали, что экспериментальные образцы сополимерных нитей, независимо от величины включения оксидвалерата (исследо-

ваны уровни 8 и 17 мол. %) в течение длительного времени (до 6 мес.) при экспонировании в стерильном фосфатном буфере (рН 7.2 при 37°C) сохраняли исходные физико-механические характеристики. С применением СЭМ исследована топография поверхности нитей; признаков их деструкции не зарегистрировано. Однако при облучении нитей  $\gamma$ -источником (доза 10.0 Мрад) происходило повреждение материала, в результате чего резкое снижение прочностных показателей нитей (прочность на разрыв и модуль Юнга) было отмечено спустя 7–8 суток. Холландом с соавторами также было исследовано разрушение нитей из сополимеров ПОБ-со-ПОВ (включение оксивалерата составило от 0 до 20 мол. %) различной молекулярной массы в фосфатном буфере и сыворотке крови при изменении температуры в сравнении с коммерческими препаратами (Dexon «S», Vicryl (композит полигликолида с полилактидом) и PDS (полидиоксанон) (Holland et al., 1990a, b). Показано, что в целом ПОА значительно более устойчивы к деградации по сравнению с известными полиэфирами. Однако в отличие от результатов работы (Miller, Williams, 1987), выявлено, что менее кристаллические сополимеры ПОБ/ПОВ деградировали в модельных системах быстрее по сравнению с высококристаллическим ПОБ. Далее было установлено, что на кинетику разрушения ПОА оказывает влияние также величина исходной величины  $M_v$  материала (Yasin, Tighe, 1992a, b).

На основании полученных результатов многоэтапная картина деградации полиоксиалканоатов выглядит следующим образом: в первый период (несколько недель) происходит растворение «вымывание» аморфной фазы, в результате чего кристаллическость полимера может несколько возрасти, далее происходит разрыв полимерных цепей и образование тетра-, димеров и мономеров и снижение молекулярной массы, Далее развиваются процессы эрозии материала и происходит собственно снижение массы полимера (или изделия). Этот процесс длителен и в зависимости от условий среды и физико-химических свойств ПОА может продолжаться многие месяцы, до 2–3 лет.

Процесс деградации полиоксиалканоатов можно существенно ускорить, облучив  $\gamma$ -источником или смешивая ПОА с другими полимерами, например, полисахарами, поликапролактоном, полилактидами и др. (Amass et al., 1998).

Биодеструкция полиоксиалканоатов происходит под воздействием ферментов деполимераз, экскретируемых микроорганизмами, а также ферментов крови и животных тканей (Jendrossek, 2001). В результате происходит процесс биодegradации ПОА в почве, воде, а также в организме высших животных и человека.

Исследовано воздействие 16 липолитических ферментов на пять типов ПОА, полученных синтетически или биосинтетическим путем (Mukai et al., 1993). Авторы установили, что ни одна липаза не

гидролизovala поли-3-оксибутират. Остальные четыре типа ПОА гидролизовались липазами, при этом интенсивность их гидролиза убывала в ряду: поли-3-пропионат > поли-4-оксибутират > поли-5-оксивалерат > поли-6-оксигексаноат. Деполимеризующая по отношению к ПОА активность телячьей сыворотки, панкреатина и синтетического желудочного сока исследована в работе (Atkins and Peacock, 1996a). Авторами подтверждена ферментативная активность данных сред по отношению к сополимеру 3-оксибутирата и 3-оксивалерата в смеси с капролактоном. При этом выявлено, что интенсивность биодеструкции полимерных микрочастиц со снижением их массы падала следующим образом: сыворотка > панкреатин > синтетический желудочный сок > буфер Хенка (Hank). Биодеструкция сополимера 3-оксиоктаноата и 3-оксигексаноата изучена *in vitro* в присутствии в среде кислой фосфатазы и  $\beta$ -глюкоуронидазы в эксперименте длительностью 60 суток. Существенного снижения веса полимера при этом не отмечено (Marois et al., 1999b).

В одной из последних работ с использованием микробной экзодеполимеразы изучена динамика деградации и прочностных характеристик моножильных нитей из ПОБ/ПОВ (включение оксивалерата 10 мол. %) (Yamane et al., 2001). Моножильные нити помещали в фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий раствор экзодеполимеразы, выделенной из *Comamonas testosteroni* (активность препарата составила 136 ед). В данной модельной системе нити очень быстро (10–26 ч.) разрушались. Их поверхность покрывалась глубокими трещинами и разрывами, что сопровождалось снижением прочности. Так, через 25 ч. экспозиции модуль Юнга нитей снизился на 60 % от исходной величины, а прочность на разрыв – практически на 80 %.

С целью выявления закономерностей биodeградации ПОА применительно к биомедицинским условиям исследована биodeградация полимерных шовных нитей в биологических средах *in vitro* и *in vivo* (Шишацкая с соавт., 2002ж). В качестве модельных сред использовали фосфатный буфер (pH 4.5, 5.2, 7.0); кровь человека, стабилизированную цитратом натрия; сыворотку крови. Образцы нитей с известными исходными показателями прочности, предварительно взвешенные и проавтоклавированные, в асептических условиях вносили в стеклянные флаконы, содержащие модельную среду, добавляли антибиотик, крышки флаконов парафинировали. Образцы экспонировали при 38°C.

В биологических средах *in vitro* (кровь, сыворотка) полимерные нити разрушались достаточно быстро и со сходной динамикой. Достоверное уменьшение массы нитей зарегистрировано через 30 сут., далее до 90 сут. скорость разрушения образцов не изменялась. Средние за этот период значения снижения массы нитей составили для ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, соответственно, 0.0019 и 0.0038 мг/сут. Од-

нако далее (90–180 сут.) биодеструкция замедлилась (до 0.0011 и 0.0014 мг/сут. соответственно), вероятно, в результате инактивации ферментов сыворотки и крови.

Как в крови, так и в сыворотке скорость убыли массы нитей, полученных из сополимера ПОБ-со-ПОВ, превосходила таковую у нитей, изготовленных из ПОБ. Это согласуется с существующими представлениями о том, что аморфные участки полиоксиполаноатов разрушаются быстрее упорядоченных зон (Abe et al., 1997; Jendrossek, 2001). Наблюдения показали, что сополимерные нити разрушаются в исследованных модельных системах быстрее ПОБ. Значения средней скорости изменения массы ПОБ-со-ПОВ нитей в 1.4–2.0 раза выше таковой у ПОБ.

С применением РЭМ исследована микроструктура поверхности нитей в ходе биодеградаци и установлено, что после 30 сут. экспонирования в крови и сыворотке топография поверхности нитей практически не отличалась от исходной; через 120 сут. отмечено появление незначительных неровностей на поверхности; спустя 180 сут. усиления дефектов не отмечено. Нити по-прежнему выглядели монолитными. Появления локальных выраженных дефектов в виде трещин, раковин или другого также не наблюдали. Отсутствие существенных изменений структуры поверхности нитей, несмотря на обнаруженную убыль массы, согласуется с исследованными показателями физико-механических свойств. Абсолютная прочность нитей ПОБ и ПОБ/ПОВ после 30 дней деградации в крови составила, соответственно, 6.4 и 8.46 Н (около 90 % от исходной), а через 90 дней – 5.77 и 7.52 Н (80 %), через 180 сут. – 5.02 и 7.12 Н. Достоверных изменений величины модуля упругости нитей на всех сроках наблюдений не отмечено, его значение для ПОБ и ПОБ/ПОВ на всем протяжении опыта составляло, соответственно, 3.6–37 и 3.1–3.3 ГПа. В сыворотке динамика и величина показателей были аналогичными.

Результаты свидетельствуют о том, что процесс биодеструкции ПОА происходит в модельных биологических средах *in vitro* с низкими скоростями, равномерно по поверхности изделий и без появления выраженных дефектов.

### **5.3. Биоабсорбция ПОА *in vivo***

Опубликованные результаты деградации полиоксиполаноатов *in vivo* весьма фрагментарны. В одной из первых работ этого направления биодегградация полиоксибутирата и сополимеров оксибутирата с оксипалератом в виде таблетированных форм исследована *in vivo* в середине 80-х годов (Korsatko et al., 1983; 1984; Wabnegg and Korsatko, 1983). Было показано, что скорость деградации полимера пропорциональна времени экспозиции имплантатов и площади их

поверхности. Детальное исследование деградации и прочностных свойств моножильных нитей, изготовленных из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (включение оксивалерата 8 и 17 мол. %) выполнено в работе (Williams, Miller., 1987; Miller, Williams, 1987). При имплантации моножильных полимерных нитей внутрибрюшинно лабораторным мышам авторами не было отмечено изменения структуры и физико-механических свойств нитей в течение 6 месяцев наблюдения, независимо от состава материала. Только после предварительного  $\gamma$ -облучения дозой 10 Мрад наблюдали снижение прочностных свойств нитей и их разрушение. Однако у авторов другой работы этого периода, напротив, деструкция пленочных образцов ПОБ зафиксирована уже спустя 2 недели после имплантации, а через год удалось обнаружить только маленькие фрагменты полимерных имплантатов (Beumer et al., 1978).

В недавних работах подтверждено, что биodeградация поли-3-оксибутирата и поли(3-оксибутирата-со-3-оксивалерата) происходит *in vivo* очень медленно (Hasirci, 2000). Как правило, поли-3-оксибутират полностью абсорбируется за 24–30 месяцев (Malm et al., 1992b; Hazari et al., 1999a).

Например, в ходе имплантации ПОБ и ПОБ-со-ПОВ внутрибрюшинно мышам зарегистрирована их деградация, однако с разными скоростями в зависимости от состава материала (Gogolewski et al., 1993a, b). В течение 6 месяцев молекулярная масса уменьшилась, соответственно, у ПОБ на 15 и ПОБ-со-ПОВ на 43 %, однако общая масса имплантатов при этом уменьшилась всего на несколько процентов. Сделан вывод о том, что ПОБ и ПОБ-со-ПОВ в сравнение с полилактидами более устойчивы к разрушению в условиях длительной эксплуатации, а их механическая прочность намного превосходит таковую у изделий из молочной кислоты, в т. ч. после температурной обработки (Gogolewski et al., 1993b). В работе (Borkenhagen et al., 1998) также показано, что имплантаты из сополимеров ПОБ-со-ПОВ разрушаются *in vivo* быстрее гомогенного ПОБ. Однако зарегистрированные авторами скорости биодеструкции полимера намного превосходили данные, полученные в работе (Gogolewski et al., 1993a,b). Так, в течение четырех месяцев сополимер ПОБ-со-ПОВ, содержащий в своем составе 8 мол. % оксивалерата, деградировал практически полностью (на 88 %), а ПОБ – только 50–60 %. В работе (Charput et al., 1995 a) масса образцов ПОБ-со-ПОВ, имплантированных животным внутримышечно, уменьшалась очень медленно. Так, через 90 недель после имплантации вес образцов составил 40–50 % от исходного. При использовании пленочных образцов ПОБ в качестве модельных перикардов у прооперированных пациентов через год было зарегистрировано достоверное сокращение площади им-

плантата на 27 % от исходной и замещение полимера новообразованными тканями (Duvernoy et al., 1995).

Ускорить процесс биодеструкции ПОБ, как установлено, можно, смешивая его с различными материалами. Так, при имплантации мышам полимерных пленок ПОБ в композиции с сахарами, скорость биодеградации композитных пленок была выше по сравнению с чистым полимером. Зарегистрировано увеличение биодеградации полимерных смесей *in vivo* по сравнению с нативным ПОБ в следующем ряду: ПОБ-декстран, ПОБ-декстрин, ПОБ-альгинат (Yasin et al., 1987). Композиты ПОА с полиуретанами также разрушаются в организме животных быстрее ПОБ и ПОБ-со-ПОВ. Например, через год после подкожной имплантации лабораторным животным убыль молекулярной массы DegraPol составила около 50 % от исходной величины (Saad et al., 1997b).

Другой тип ПОА – сополимеры оксооктаноата и оксигексаноата (3-ПОО-со-3-ПОГ) деградирует *in vivo* также медленно. В работе (Williams et al., 1999) показано, что при подкожной имплантации 3-ПОО-со-3-ПОГ мышам его молекулярная масса в течение 40 недель снизилась всего на 50 %. Исследования подтвердили, что медленная биодеградация данного ПОА происходит равномерно во всем объеме имплантата.

Таким образом, несколько типов ПОА (3-ПОБ, 3-ПОБ-со-3-ПОВ, 3-ПОО-со-3-ПОГ) разрушаются *in vivo* крайне медленно, аналогично *in vitro*; исключение составляет гомополимер 4-ПОБ. Как установлено в работе (Martin et al., 1999), деградация 4-ПОБ *in vivo* происходит достаточно быстро. Скорость его биодеструкции особенно возрастает с увеличением пористости имплантатов. Так, при подкожной имплантации крысам пленок и пористых образцов (степень пористости 50 и 80 %) из 4-ПОБ убыль их массы за 10 недель составила, соответственно, 20, 50 и около 100 % от исходной. Среднее значение молекулярной массы 4-ПОБ также существенно снизилось, однако снижение величины не зависело от формы имплантата.

В серии недавних работ исследована биодеградация различных конструкций из ПОА при имплантации лабораторным животным на длительные сроки (Lukinska et al., 1997; Shum-Tim et al., 1999; Stock et al., 1999; Korkusuz et al., 2001). Авторами показано, что все имплантаты, несмотря на отмеченную биодеструкцию, выполняли свои функции в течение всего периода наблюдения (от 6 мес. до 2.5 лет). Остаточная масса изделий в разных экспериментах была различной (от 90 до 40 % от исходной).

Таким образом, в целом, процесс биодеструкции ПОА *in vivo* длителен. Важно отметить, что скорость деструкции изделий на основе ПОА во всех экспериментах соответствовала кинетике формирования новых тканей.



Деградикация полимерных нитей, изготовленных из ПОА двух типов, синтезированных бактериями *R. eutropha* В 5786 в Институте биофизики СО РАН, исследована *in vivo* при непосредственном контакте имплантированных нитей с тканями животных, а также с использованием диффузионных камер (Шишацкая с соавт., 2002ж). Применение диффузионных камер при имплантации испытуемых образцов исключает непосредственный контакт имплантата с тканями и препятствует формированию грубой фиброзной капсулы. Это дает возможность исследовать биосовместимость и биостабильность материала с точки зрения истинной клеточной реакции (Розанова, 1999).

Силиконовые камеры собственной конструкции с размещенными в них образцами шовных нитей были имплантированы крысам подкожно в шейную складку (Шишацкая с соавт., 2002ж). В первый период (до 60 сут.), в отличие от условий *in vitro*, изменения массы были менее значительными по сравнению с последующим периодом (90–180 сут.). В течение последнего средняя скорость биодеструкции нитей из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ-возросла, соответственно, до 0.0024 и 0.0035 мг/сут. Спустя 180 сут. остаточная масса нитей ПОБ и ПОБ-со-ПОВ составила 74 и 62 % от исходной. Таким образом, скорость биодеструкции сополимерных нитей по сравнению с ПОБ за наблюдаемый период была выше. На рис. 5.4 представлены микрофотографии нитей в ходе биодеградации *in vivo*.

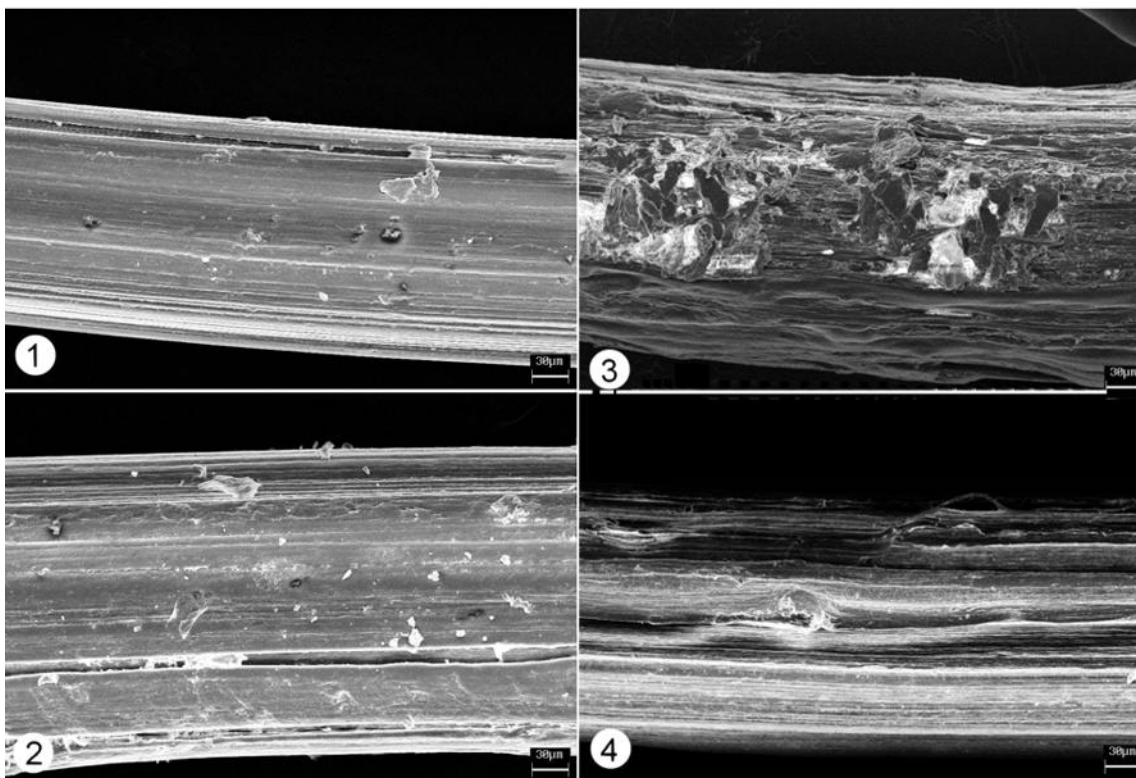


Рис. 5.4. РЭМ снимки поверхности полимерных нитей из ПОБ-со-ПОВ в ходе деградации *in vivo*: 1 – исходная, 2 – 90, 3 – 120 и 4 – 180 суток. Маркер 30 мкм (Шишацкая с соавт., 2002ж).

Спустя 90 сут. после имплантации существенных изменений топографии поверхности нитей не зафиксировано, несмотря на достоверное уменьшение их массы. Кроме незначительных шероховатостей (аналогично изменениям *in vitro*), более существенных дефектов нитей не отмечено. На более поздних сроках (120 и 180 сут.) на поверхности нитей зафиксированы адгезированные клетки. После их удаления в ряде случаев отмечены локальные дефекты на поверхности нитей – возможно, результат лизосомальной деятельности полиядерных макрофагов, доля которых в клеточном содержимом камер на этих сроках составляла 20–30 % от общего числа клеток. Показатели величины абсолютной прочности и модуля упругости нитей в целом аналогичны экспериментам *in vitro*: за 180 сут. экспозиции камер *in vivo* абсолютная прочность размещенных в них нитей ПОБ и ПОБ-со-ПОВ снизилась от  $7.1 \pm 0.21$  и  $9.40 \pm 0.19$  до 5.2 и 6.0 Н, то есть всего на 33–37 % от исходных значений.

Как видно на рис. 5.4, нити представляют из себя «пучок» тонких фибрилл, диаметром несколько микрон, соединенных между собой аморфным материалом. Фибриллы, в свою очередь, представляют из себя образования микрофибрилл с диаметром около 50–100 нм. Последние состоят из выпрямленных полимерных цепей, имеют степень кристалличности, близкую к 100 %, и являются основными элементами структуры, несущими механическую нагрузку при растяжении. Поскольку деградация ПОА происходит в первую очередь в аморфных областях, с течением времени происходит лишь «вымывание» аморфных межфибриллярных прослоек, а количество и структура микрофибрилл остаются неизменными. Это приводит к незначительному (по-видимому, пропорционально их объему) падению абсолютной прочности.

Анализ клеточного содержимого камер показал, что с увеличением длительности имплантирования количество клеток в них возрастало, главным образом за счет одноядерных клеток макрофагального типа. Параллельно отмечено некоторое увеличение клеток типа гигантских клеток инородных тел. У последних количество ядер на клетку колебалось в эксперименте от  $1,66 \pm 0,92$  до  $5,75 \pm 1,77$ . Следовательно, в условиях *in vivo* имплантаты подвержены не только воздействию ферментов тканевой жидкости, но и клеток, которые, проникая в камеры, адгезировали на поверхности нитей.

Следующий этап был связан с изучением состояния нитей, имплантированных непосредственно в мышечную ткань животных, где они, помимо воздействия гуморальных факторов и клеток, дополнительно подвержены динамическим нагрузкам. В постоперационном периоде в результате формирования вокруг нитей фиброзной капсулы с течением времени вновь образованные ткани плотно окружали нити, «врастая» в них и образуя на границе «полимерные нити – ткани» плотный контакт. Тем не менее, в после завершения экспери-

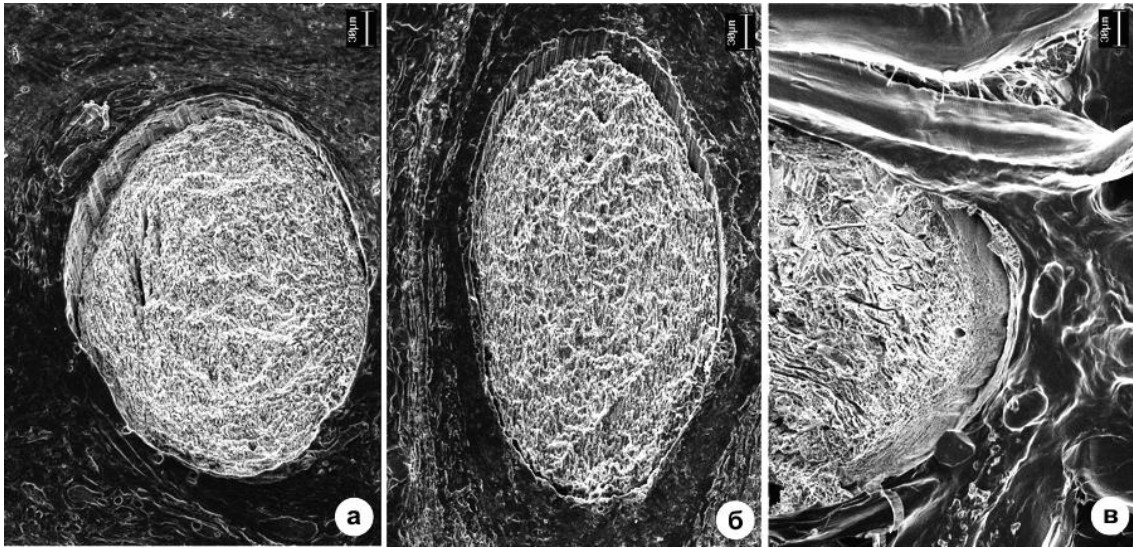


Рис. 5.5. РЭМ снимки топографии протравленной NaOH поверхности срезов на разных сроках постоперационного периода: а – 14, б – 120, в – 180 суток после имплантации. Маркер 30 мкм. (Шишацкая с соавт., 2002ж).

мента структура нитей в целом не изменилась и грубых дефектов типа узур, раковин и трещин обнаружено не было.

Возник вопрос, имело ли место разрушение нитей в объеме? Для ответа на вопрос исследованы ультраструктура срезов фрагментов тканей с имплантатами (рис.5.5).

На срезе после 14 сут. имплантации (рис.5.5а) видны единичные микротрещины. Спустя 120 и 180 сут. после имплантации состояние нитей принципиально не изменилось (рис. 5.5б, в). Отсутствие усиления дефектов структуры нити в объеме на течение 180 сут. свидетельствует в пользу предположения о том, что происхождение микротрещин и пор скорее всего связано с неравномерным травлением щелочью отдельных микрообластей нитей, возможно, межфибрилярного аморфного матрикса, так как известно, что ПОА гидролизуются в щелочной среде.

Полученные результаты изучения биодеструкции нитей из двух типов ПОА позволяют заключить, что биодеструкция полиоксиканоатов происходит с достаточно низкими скоростями, при постепенном (послойном) выщелачивании материала с поверхности без образования грубых дефектов и резкой потери прочности шовных нитей. Показано, что деградация исследованных шовных нитей из полиоксиканоатов в биологических средах происходит по гуморальному и клеточному пути с активным участием макрофагов и гигантских клеток инородных тел. Скорость биодеструкции сополимеров ПОБ-со-ПОВ превосходит таковую у ПОБ. В целом имеющиеся данные позволяют констатировать пригодность ПОА для изготовления биodeградируемых имплантатов длительного функционирования.

## Глава 6. БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ

Одно из основных требований, предъявляемых к материалам медицинского назначения, заключается в том, что данные материалы должны быть биологически совместимы с живым организмом. Такие материалы при вживлении в организм и пребывании в нем длительное время не должны вызывать негативных реакций со стороны тканей и организма в целом.

Следует отметить, что понятие «биосовместимость» не имеет четкого толкования до настоящего времени (Севастьянов, 1999). Биосовместимыми называют материалы, способные сосуществовать совместно с живым организмом, не нанося ему вреда (Танзава, 1981). По определению Н. А. Платэ и В. А. Васильева биосовместимыми являются «Полимеры, способные к метаболизму...» (Платэ, Васильев, 1986). На конференции по биосовместимости, состоявшейся в 1994 г в Великобритании, было предложено под биосовместимостью «...понимать способность материала, изделия или устройства выполнять свои функции и не вызывать отрицательных реакций в организме «хозяина» (Consensus conference..., 1994). В расширенном толковании биосовместимости следует подразумевать не только взаимное «сосуществование» двух субстанций (искусственной и естественной), но и то, что искусственный материал должен выполнять функции живой материи. При этом совершенно очевидно, что биосовместимость того или иного материала или имплантируемого элемента определяется не только его химической и надмолекулярной структурой, но и формой, топографией поверхности, спецификой взаимодействия с окружающими тканями (Полимеры медицинского назначения, 1981; Пхакадзе, 1990; Biomedical Polymers, 1994; Биосовместимость, 1999; Amass et al., 1999).

Биосовместимость полиоксибутирата (ЗПОБ) основывается на том, что мономер, образующий данный полимер и являющийся продуктом биодеградации ПОБ – *R*- $\beta$ -оксимасляная кислота, является естественным продуктом обмена высших животных и человека и присутствует в крови последних. Концентрация данной оксикислоты у взрослых организмов в норме составляет 3–10 мг на 100 мл крови (Hocking and Marchessault, 1994). Данную кислоту используют в терапевтических целях для восстановления уровня белков (Pawan and Semple, 1983), вводят внутривенно пациентам в качестве источника энергии (Hiraide and Katayama, 1990), а также используют в глазной хирургии как увлажняющий раствор для поддержания тканей (Chen and Chen, 1992).

Установлено, что помимо мономеров  $\beta$ -оксимасляной кислоты, в животных тканях в составе клеточных мембран присутствуют низкомолекулярные полимеры  $\beta$ -оксимасляной кислоты. Так, при исследовании группы из 24 доноров установлено (Reuch et al., 1992), что общая концентрация ПОБ в плазме человека существенно варьирует, от 0.6 до 18.2 мг/л. При этом до 20–30 % об общего пула ПОБ плазмы связано с липопротеинами; в т. ч.: 6–14 % – с очень низкоплотными липопротеинами, 8–16 % с низкоплотными липопротеинами и менее 3 % – с высокоплотными липопротеинами. Основная фракция ПОБ в плазме (около 70–80 %) имеет плотность 1.22 г/мл. Определено, что альбумин является основным ПОБ-связывающим белком, а общий уровень ПОБ положительно коррелирует с уровнем низкоплотного холестерина и отрицательно – с уровнем высокоплотного холестерина. В связи с последним, содержание ПОБ в плазме и его уровень во фракциях липопротеинов имеет важное физиологическое значение. Выявлено, что ПОБ обладает незначительной оральной токсичностью; его LD<sub>50</sub> намного выше, чем 5 г/кг веса (Holmes, 1988).

Мономерный компонент 4-полиоксибутират, 4-оксимасляная кислота, также является естественным продуктом обмена и присутствует в тканях внутренних органов, – в мозге, почках, печени, селезенке, а также в мышцах (Nelson, 1981). Установлено, что 4-оксимасляная кислота обладает анестезирующим и седативным эффектом (Entholzner et al., 1995) и используется в связи с этим в клинической практике.

Таким образом, полиоксибутират обладает высокой биосовместимостью, однако вследствие хрупкости и невысокой механической прочности имеет существенные ограничения для применения. Сополимеры оксибутирата с оксивалератом, сополимеры оксиктаноата и оксигексаноата обладают лучшими в сравнение с ПОБ технологическими свойствами, поэтому привлекательны для использования (Sudeush et al., 2000) Однако наличие в материале, помимо оксимасляной кислоты, других мономеров делает необходимым проверку токсикологических свойств материала в полном объеме.

Имеющиеся результаты токсикологических исследований сополимеров оксибутирата и оксивалерата, выполненные в культурах животных клеток *in vitro*, а также на лабораторных животных *in vivo*, свидетельствуют о возможном проявлении воспалительных реакций, интенсивность которых коррелирует с содержанием оксивалерата в ПОА (Gogolewski et al., 1993; Chaput et al., 1995). Нельзя, однако, не отметить, что реакция клеток и тканей на имплантант зависит не только от химического состава материала, но также и от способов переработки и формы изделий, характеристик поверхности и методов ее обработки, степени химической чистоты материала.

Анализ литературы показал, что результаты токсикологических исследований полиоксиалканоатов часто были получены на промышленных образцах, а не на материале медицинской степени чистоты (Williams and Martin, 2002). Вместе с тем установлено, что в промышленных образцах полиоксибутирата и сополимеров оксибутирата с оксивалератом, а также других ПОА могут присутствовать обломки микробных клеток, содержащие липополисахаридные и другие комплексы, способные вызывать негативные реакции клеток в системах *in vitro* и пирогенные реакции *in vivo* (Rouxhet, 1998; Garrido, 1999). Известно, что эндотоксины ЛПС грамотрицательных микроорганизмов способны вызывать воспалительные и пирогенные реакции (Ritschel et al., 1988). В работах (Lee et al., 1999; Williams et al., 1999) установлено, что количество эндотоксинов в образцах ПОА может составлять до 100–120 U/g. На примере двух продуцентов (природного штамма *A. eutrophus* и рекомбинантного штамма *E. coli*) показано, что в зависимости от способа экстракции полимера из бактериальной биомассы уровень эндотоксинов в полимере можно существенно снизить, до 20 U/g и менее. Это позволяет получать образцы материала, пригодные для медицинских приложений с допустимым уровнем эндотоксинов.

## **6.1. Исследование биосовместимости полиоксиалканоатов *in vitro***

Культивируемые *in vitro* животные клетки являются признанной моделью оценки безопасности новых материалов, лекарственных и косметических средств, пищевых добавок (Фрешни, 1989).

Первый и наиболее изученный из семейства полиоксиалканоатов высококристаллический полимер  $\beta$ -оксимасляной кислоты обладает идеальной биосовместимостью, потому что сам полимер и его дериваты являются естественными продуктам обмена клеток и присутствуют в крови и тканях (Sudesh et al., 200; Martin and Williams, 2002). Однако вследствие хрупкости и невысокой механической прочности полиоксибутират имеет существенные ограничения для применения.

В настоящее время, несмотря на разнообразие, для биомедицинских применений активно исследуется, как было отмечено выше, всего несколько типов ПОА: изомеры и сополимеры оксимасляной кислоты, сополимеры оксиоктаноата и оксигексаноата и сополимеры оксибутирата с оксивалератом. Последние обладают хорошими прочностными свойствами, которые широко варьируют в зависимости от соотношения мономеров, поэтому привлекательны для использования, однако наличие в составе гетерополимерных ПОА, помимо оксимасляной кислоты, других мономеров, в частности, окси-

валерата, делает необходимым проверку токсикологических свойств материала в полном объеме.

Имеющиеся результаты токсикологических исследований сополимеров оксибутирата и оксивалерата, выполненные в культурах животных клеток *in vitro*, а также *in vivo*, свидетельствуют о возможном проявлении воспалительных реакций, интенсивность которых связывают с содержанием оксивалерата в ПОА (Gogolewski et al., 1993; Chaput et al., 1995; Reuch et al., 1999).

Важным моментом в исследовании токсикологических свойств ПОА явилось установление присутствия в промышленных образцах эндотоксинов за счет липополисахаридных комплексов клеточных мембран бактерий – продуцентов полимеров, уровень которых может достигать до 100 U (Lee et al., 1999; Williams et al., 1999).

Принципиальная пригодность полимерных пленок из ПОБ для культивирования животных клеток была показана в конце 80-х – начале 90-х гг. (Davies et al., 1989; Engelberg, Kohn, 1991). На примере культуры фибробластов мыши в течение длительного культивирования не обнаружено негативного воздействия ПОБ на рост клеток (Korsatko-Wabnegg et al., 1984). Тестирование гранул ПОБ *in vitro* с использованием хориоаллантаоидных мембран яиц не выявило проявления воспалительных реакций (Saito et al., 1991). Оценка потенциальной токсичности продуктов деградации ПОБ и ПОБ/ПОВ, экстрагируемых буферными растворами при 37°C в сравнение с другими биоразрушаемыми полимерами (полигликолидами и полилактидами) показало предпочтительность ПОА, т.к. продукты их деструкции (3- и 4-оксимасляная кислота и 3-оксивалериановая кислота) обладают в меньшей степени биологической активностью и кислотностью (pK<sub>α</sub> 4.70 и 4.72 соответственно) в сравнении, например, с гликолевой (pK<sub>α</sub> 3.83) и молочной (pK<sub>α</sub> 3.08) кислотами (Taylor et al., 1994).

Имеющиеся результаты исследования влияния оксивалерата на жизнеспособность животных клеток весьма противоречивы. Опубликованные данные включают как декларирование полной биологической инертности ПОБ-со-ПОВ *in vitro*, например, в культурах макрофагов и фибробластов (Saad et al., 1997a,b), так и факты цитотоксичности, выраженные, однако, в различной степени в культурах различных клеток. Так, в работах Чапута с соавторами (Чапут с соавт., 1995а, б; Chaput et al., 1995а, б) в ходе исследования роста фибробластов в присутствии экстрактов ПОБ-со-ПОВ с разным включением оксивалерата (7, 14 и 22 мол. %) был обнаружен цитотоксический эффект образцов с наибольшим содержанием оксивалерата. В другой работе в ходе исследования экстрактов из промышленных образцов сополимеров оксибутирата с оксивалератом в культуре фибробластов также отмечено незначительное подавление пролиферативной активности клеток (Dang et al., 1996). При сравне-

нии роста фибробластов мышцы на пористых пленках из сополимера оксибутирата с оксивалератом (включение оксивалерата 9 мол. %) в сравнение с подложкой из бычьего коллагена установили, что в течение 35 суток рост клеток был сопоставимым, однако продукция белка клетками в 4-х недельных культурах фибробластов была в присутствии ПОБ-со-ПОВ практически в 2 раза выше по сравнению с таковой на коллагеновой подложке (Rivard et al., 1995). Далее пористые объемные подложки из сополимеров ПОБ-со-ПОВ (с включением 9 мол. % оксивалерата) исследованы для целей тканевой инженерии на примере первичных культур овечьих хондроцитов и остеобластов в сравнение в коллагеновыми пластинами (бычий коллаген I-го типа) (Rivard et al., 1996). В течение 35 суток наблюдали рост клеток во всем объеме конструкции, однако прирост клеток на сополимере был существенно (практически на 40 %) ниже в сравнении с контролем (бычий коллаген) в течение всего периода наблюдения.

Последовательные исследования цитотоксичности ПОА и композитов ПОА с различными типами полиуретанов (материал DegraPol/btc<sup>®</sup>) проводят в Швейцарии под руководством профессора Ульриха Сатера. Показано, что при культивировании макрофагов мышцы линии NIH3T3 и фибробластов линии J774 *in vitro* в среде, содержащей частицы ПОБ, клетки нормально росли, деградируя постепенно ПОБ. Однако при увеличении концентрации полимерных частиц в культуре макрофагов отмечено снижение адгезии и жизнеспособности клеток и повышение продукции NO и TNF (TNF- $\alpha$ -фактор). В культуре фибробластов в аналогичных условиях зарегистрировано только снижение фагоцитоза без изменения жизнеспособности клеток и продукции коллагена и фибронектина (Saad et al., 1996; 1997a). Исследование пористых пленок из DegraPol/btc<sup>®</sup> в культурах макрофагов и фибробластов показало, что адгезия клеток составляла от 65 до 100 % от контроля (полистерина), при этом клетки не изменяли морфологию и нормально пролиферировали. Макрофаги в аналогичных условиях не изменяли скорости роста и синтеза NO и TNF (Saad et al., 1997b). Испытания DegraPol/btc<sup>®</sup> в первичной культуре тиббиальных остеобластов крысы (полимер был внесен в виде мелких кристаллических частиц с флюоресцентными метками (2–20 мкм) показало, что клетки имеют склонность к поглощению полимерных частиц в первые часы культивирования. В ходе 16 суток не отмечено изменения уровня продукции коллагена и остеокальцина, однако уровень щелочной фосфатазы клеток на 4 сутки увеличился до 170 % от контроля. Уровень ЩФ положительно коррелировал с количеством полимерных частиц, поглощенных остеобластами (Saad et al., 1998). Последующее исследование DegraPol/btc<sup>®</sup> в первичных культурах остеобластов и хондроцитов мышцы показало, что на композитах «ПОБ-полиуретаны», содержа-



щих дополнительно в качестве смягчающего агента капролактама, клетки хорошо адгезировали, заполняя не только поверхность, но и поры материала (Behrend et al., 1998). При небольших концентрациях DegraPol в среде (2 мг/мл или 40 пг/клетка) клетки сохраняли нормальную морфологию, при этом макрофаги в большей степени по сравнению с остеобластами фагоцитировали частицы ПОБ. Однако при повышении концентрации полимера в среде до 20 мг/мл (400 пг/кл) отмечено снижение жизнеспособности клеток, причем в большей степени у остеобластов, при этом продукция остеокальцина и коллагена типа I не изменялась (Saad et al., 1999). Далее было исследовано влияние витамина D на клетки, пролиферирующие в присутствии ПОА (Saad et al., 2000). Оказалось, что наличие витамина не влияет на продукцию остеокальцина, но тормозит рост клеток и продукцию коллагена. В целом, материал оценен положительно для потенциального применения в будущем в восстановительной хирургии костных тканей.

В связи с противоречивостью данных о биологической инертности полиоксиалканоатов в цикле работ Института биофизики СО РАН и НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ проведено детальное исследование возможного проявления цитотоксичности со стороны ПОА с учетом химического состава полимеров и степени химической чистоты (Шишацкая с соавт., 2000; 2001; Севастьянов с соавт., 2002; Shishatskaya et al., 2003).

Известно, что свойства биоматериалов и степень биосовместимости изделий из них определяются не только структурой и базовыми физико-химическими свойствами исходного материала, но в существенной степени зависят от чистоты образцов и способа получения изделий. Поэтому на первом этапе было проведено исследование санитарно-химических свойств водных вытяжек, полученных из пленок и волокон, изготовленных из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (Севастьянов с соавт., 2001), которые являются обязательными при тестировании новых биоматериалов и предворяют токсикологические испытания (Биосовместимость, 1999).

Экспериментальные образцы полиоксиалканоатов, синтезированных *Ralstonia eutropha* В 5786, исследованы общепринятыми интегральными методами оценки возможной миграции в модельную среду (дистиллированная вода при различных значениях pH) химических компонентов, входящих в состав полимеров (оксимасляной и оксивалериановой кислот) (Севастьянов с соавт., 2001; Шишацкая с соавт., 2002). В полученных образцах ПОА не обнаружено примесей белковой и углеводной природы, а также липидов. Содержание отдельных минеральных элементов в образцах составляло суммарно менее 0.1 %; среди них идентифицированы: Na (0.036–0.013), Ca

(0.005), Mg (0.0013–0.0025), Fe (0.0052–0.009), Cu (0.0046–0.0145), Zn (0.0019–0.0045) в % к абсолютно сухому веществу.

Спектроскопия вытяжек в диапазоне ультрафиолетовых волн, позволяющая определять наличие свободных С=C связей, мигрирующих из изделия в среду, показала, что образцы ПОА, независимо от химического состава, отвечают требованиям, предъявляемым к хирургическим материалам. В вытяжках не обнаружено мономеров β-оксикислот (C<sub>4</sub> и C<sub>5</sub>), входящих в состав исследованных полиоксисилканоатов, а также бромлирующих веществ. Показатели окисляемости вытяжек, полученных из полимерных пленок ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, так же были значительно ниже уровней, допустимых для материалов медицинского назначения.

Масс-спектральным анализом в вытяжках не обнаружено присутствия мономеров β-оксимасляной и β-оксивалериановой кислот (таблица 6.1).

Для исследования санитарно-химических свойств ПОА-шовных нитей получали водные вытяжки экспонированием образцов в дистиллированной воде в течение 3 сут. при 37°. Изучена также зависимость санитарно-химических показателей водных вытяжек от исходной величины рН воды, использованной в опыте (табл. 6.2).

Таким образом, по изученным показателям принципиальных отличий санитарно-химических свойств у гомогенного полиоксибутирата и сополимерных полиоксисилканоатов не обнаружено. Показано, что все образцы ПОА соответствуют требованиям, предъявляемым к материалам и изделиям медицинского назначения по данным показателям.

**Таблица 6.1**

**Санитарно-химические показатели водных вытяжек ПОА**  
(Севастьянов с соавт., 2001)

| Показатель  | Образец    | Время отбора проб |            |            | Допустимый уровень сдвига* |
|---|------------|-------------------|------------|------------|----------------------------|
|   |            | 3 сут.            | 7 сут.     | 10 сут.    |                            |
| рН<br>(ΔрН/рН <sub>контр</sub> )                        | ПОБ        | +0.08/6.90        | +0.13/7.10 | +0.30/7.05 | от 0.3<br>до ± 1.0         |
|   | ПОБ-со-ПОВ | +0.15/6.90        | +0.10/7.10 | +0.17/7.05 |                            |
| Сдвиг оптической плотности<br>(Δ D/D <sub>контр</sub> ) | ПОБ        | 0                 | +0.053     | +0.058     | ±0.3                       |
|   | ПОБ-со-ПОВ | 0                 | +0.007     | +0.008     |                            |
| Окисляемость<br>(мг O <sub>2</sub> /л)                  | ПОБ        | 0                 | 0          | 0          | 2.0 мг O <sub>2</sub> /л   |
|   | ПОБ-со-ПОВ | 0                 | 0          | 0          |                            |
| Бромируемость<br>(мг Br <sub>2</sub> /л)                | ПОБ        | 0                 | 0          | 0          | 1.0мг Br <sub>2</sub> /л   |
|   | ПОБ-со-ПОВ | 0                 | 0          | 0          |                            |
| Свободные мономеры β-оксикислот                         | ПОБ        | 0                 | 0          | 0          | 0.1 мг/л                   |
|   | ПОБ-со-ПОВ | 0                 | 0          | 0          |                            |

\*Биосовместимость, 1999.

Таблица 6.2

Санитарно-химические исследования вытяжек шовных нитей из ПОА при различных значения рН исходной воды (Севастьянов с соавт., 2001)

| Показатель   | Образец        | Исходное рН воды         |                          |                          |
|--|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  |                | 4.5                      | 7                        | 10                       |
| рН<br>( $\Delta \text{pH}/\text{pH}_{\text{КОНТР}}$ )      | ПОБ<br>ПОБ/ПОВ | +0.06/4.56<br>-0.01/4.49 | +0.10/7.10<br>+0.03/7.03 | -0.02/9.98<br>-0.10/9.90 |
| Сдвиг оптической плотности ( $\Delta D/D_{\text{КОНТР}}$ ) | ПОБ<br>ПОБ/ПОВ | 0<br>0                   | 0<br>0                   | +0.032<br>+0.28          |
| Окисляемость<br>(мг $\text{O}_2/\text{л}$ )                | ПОБ<br>ПОБ/ПОВ | 0<br>0                   | 0<br>0                   | 0<br>0                   |
| Бромируемость<br>(мг $\text{Br}_2/\text{л}$ )              | ПОБ<br>ПОБ/ПОВ | 0<br>0                   | 0<br>0                   | 0<br>0                   |
| Свободные мономеры<br>$\beta$ -оксикислот                  | ПОБ<br>ПОБ/ПОВ | 0<br>0                   | 0<br>0                   | 0<br>0                   |

В ходе культивирования фибробластов мыши линии NIH 3T3 на полимерных пленках, независимо от их состава, клетки сохраняли морфологию, характерную для нормальных клеток, выращиваемых в контроле на стекле. Оценка жизнеспособности клеток при помощи метода прижизненного окрашивания трипановым синим показала, что  $99.8 \pm 0.2$  % клеток, культивируемых на полимерных пленках из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (содержание оксидвалерата от 4 до 30 мол. %) не включали краситель, то есть сохраняли высокую жизнеспособность в отличие от взятого для сравнения полиэтилена. Культивирование фибробластов на полимерных пленках в течение трех суток не влияло на синтез белка в культуре. Время удвоения фибробластов, культивируемых при прямом контакте на полимерных пленках всех типов соответствовало времени генерации клеток, культивируемых в контроле на стекле, и составляло  $25 \pm 2$  ч. (Шишацкая с соавт., 2001).

Далее под руководством доктора биологических наук Н. А. Сеткова было исследовано влияние пленочных образцов ПОА на синтез ДНК в клетках *in vitro*, стимулированных к пролиферации (Шишацкая с соавт., 2001) (рис. 6.1), так как такие клетки наиболее чувствительны к повреждающим воздействиям цитотоксических факторов (Епифанова с соавт., 1983). Были взяты фибробласты мыши NIH 3T3, относящиеся к минимально трансформированным клеточным линиям, а также первичные культуры паренхимных (гепатоциты) и непаренхимных (главным образом, эндотелиальных) клеток печени мыши. Выбор культур обусловлен следующим: фибробласты непосредственно участвуют в процессах воспаления и инкапсулирования любых инородных включений, а клетки печени, помимо детоксикационной функции, обладают повышенной, по сравнению с другими клетками, чувствительностью к воздействию цитотоксических факторов.

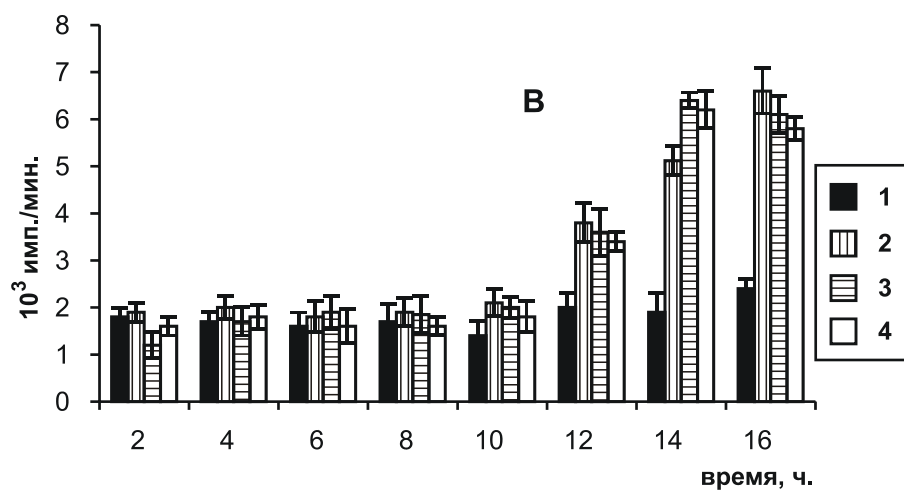
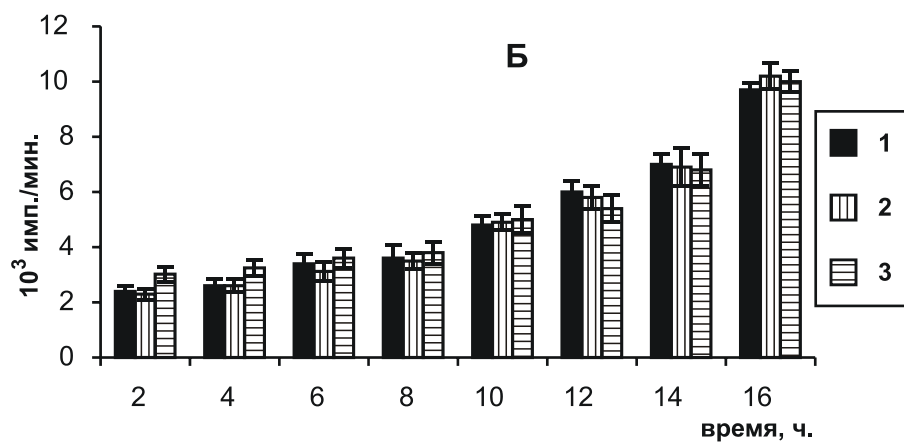
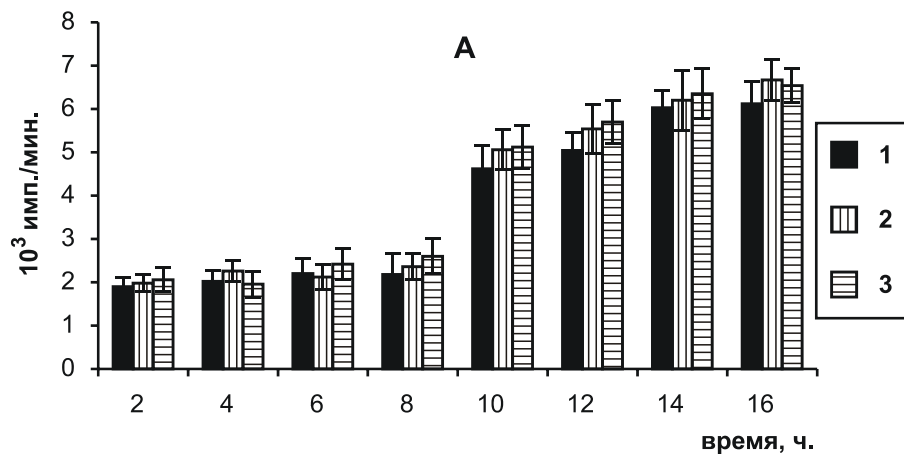


Рис. 6.1. Кинетика включения  $^3\text{H}$ -тимидина в фибробласты мыши линии NIH 3T3 (А), клетки эндотелия (Б) и гепатоциты (В) в среде с 10 % ЭТС, культивируемых на: 1 – стекле (контроль), 2 и 3 – мембранах из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, 4 – на стекле, покрытом коллагеном. Метка – кумулятивная.

Культуру покоящихся фибробластов линии NIH 3T3 получали по стандартной методике. Стимуляцию пролиферативной активности клеток проводили путем смены среды на свежую, содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Гепатоциты выделяли с помощью нерециркуляционной двухэтапной (неэнзиматической и энзиматической) перфузии печени наркотизированных мышей по методу Дудиной-Барковской и Миттельмана. Клетки NIH 3T3 культивировали на среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НПО «Вектор», Новосибирск), 1.0 mM L-глутамина, 10 mM HEPES буфера и 100 мкг/мл канамицина сульфата (BDSL, UK). Гепатоциты ресуспендировали в смеси сред DMEM+NCTC-135 (1:1) (BDSL, UK), содержащей 5 % инактивированной при 56°C ЭТС; 0.1 % глюкозы; 0.2 % сывороточного альбумина для клеточных культур; 0,5 мкг/мл инсулина; 50 нг/мл дексаметазона; 0.2 мкг/мл глюкагона (Sigma, США); 0,02 mM  $\beta$ -меркаптоэтанола; 10 mM HEPES буфера и 100 мкг/мл канамицина сульфата. Эндотелиальные клетки ресуспендировали в среде Ham's F12 (BDSL, UK) с добавлением 10 % ЭТС, в которой наращивали их количество, проводя 2–3 пассажа с помощью 0.2 % раствора коллагеназы, разбавленного 0,02 % раствором версена.

Клетки высевали в пенициллиновые флаконы (по 5 флаконов на каждую экспериментальную точку), содержащие пленки из ПОА и в качестве контроля – стекло; объем среды составлял в 2 мл с добавлением  $^3\text{H}$ -тимидина (37 кБк/мл; 92,5 ГБк/мМ). Исходная концентрация фибробластов и эндотелиальных клеток составляла по 30 000, гепатоцитов – 50 000 в 1 мл. Культивирование проводили в течение 16 ч. в гумидной атмосфере с 5 %  $\text{CO}_2$  с периодическим отбором клеток для исследований.

В ходе культивирования клеток в среде с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) на поверхности мембран из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ не обнаружено снижения включения  $^3\text{H}$ -тимидина ядрами всех типов клеток, стимулированных к пролиферации, по сравнению с контролем (стекло). Следовательно, прямой контакт клеток с поверхностью мембран из ПОА обоих типов не приводил к подавлению синтеза ДНК и не ингибировал клетки.

Культивирование фибробластов и гепатоцитов в течение трех суток при прямом контакте с поверхностью мембран из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ не влияло на время генерации клеток и синтез белка. Эти результаты свидетельствуют о том, что очищенные образцы полиоксибутирата, а также сополимеров оксибутирата с оксивалератом, не оказывали токсического воздействия не только на морфологию и рост клеток, но и на синтез белка, а также активность матричных процессов.

Физико-механические свойства и степень биосовместимости изделий на их основе определяются не только структурой и базовыми физико-химическими свойствами исходного полимерного материала, но в существенной степени зависят от чистоты образцов и способа получения изделий (Williams et al., 1999). Когда в работе (Чапут с соавт., 1995; Chaput et al., 1995a, b) исследовали цитотоксичность ПОб-со-ПОВ в культуре фибробластов, культивируемых при прямом контакте с полимером и на агаре с добавлением водных экстрактов ПОА, было установлено, что не только увеличение доли оксивалерата (от 7 до 22 мол. %) вызывает незначительный цитотоксический эффект, но также и условия получения экстрактов (температура, длительность экстракции и др.). В серии работ Саада с соавторами показано, что пористые DegraPol<sup>®</sup> – хороший материал для роста животных клеток разных типов (Saad et al., 1996; 1997a, b). Вместе с тем, при увеличении концентрации частиц материала в среде и их размеров (от 1 до 20 мкм) клетки разных типов в различной степени снижали скорость роста и продукцию метаболитов, например, коллагена, фибронектина и др. (Saad et al., 1999). Существенное влияние на адгезию и рост клеток оказывает структура поверхности полимерных изделий. В этой связи значимыми являются результаты работы (Rouxhet et al., 1998), в которой было исследовано влияние модификации поверхности полимерных пленок различными белками на адгезию и пролиферацию мононуклеарных макрофагов. Авторы установили, что модификация поверхности полимерных пленок фибронектином в отличие от альбумина или коллагена улучшает адгезию клеток оказывает. Есть сведения о том, что при обработке поверхности пленок и мембран из полиоксиалканоатов, например, лазерной резкой (Lootz et al., 2001), плазмой при низком давлении (Nitschke et al., 2002), а также ферментативно (липазами) или химическим гидролизом (NaOH (Yang et al., 2002), влияющими на пористость и гидрофильность пленок, значительно улучшаются функциональные характеристики изделий, повышается адгезия и рост клеток.

В отношении других типов ПОА пока данные весьма ограничены. Недавно показано, что поверхность пленок из сополимера оксиктаноата и оксигексаноата обладает хорошими адгезионными свойствами по отношению к животным клеткам (Stock et al., 1998). Хорошие адгезионные свойства пленок, изготовленных из сополимера оксибутирата и оксигексаноата (ПОб-со-ПОГ), по отношению к фибробластам мыши показаны в работе (Yang et al., 2002). Авторы отметили, что клетки росли на таких пленках лучше, чем на полилактидных или изготовленных из полиоксибутирата.

Как было отмечено в Главе 1, все большую значимость при создании биоискусственных органов и тканей приобретают пористые пленочные и трехмерные матрицы на основе биодеградируемых



Рис. 6.2. Стволовые клетки костного мозга крысы линии Вистар на поверхности ПОБ-со-ПОВ включение оксидвалерата 15 мол. %). Время культивирования клеток – 9 дней. Увеличение 200 (неопубликованные данные В. И. Севастьянова).

биополимеров. Рисунок 6.2 иллюстрирует положительный результат применения для культивирования клеток пленочного матрикса «ЭластоПОБ» (ЗАО «Биомир-сервис», Москва), изготовленного из разработанной в НИИ трансплантологии и искусственных органов композиции на основе сополимера ПОБ-со-ПОВ (Институт биофизики СО РАН), высокомолекулярного гидрофильного пластификатора и поробразователя. При культивировании стволовых клеток костного мозга крысы линии Vistar (лаборатория стволовых клеток НИИ трансплантологии и искусственных органов), оказалось, что клетки хорошо прикрепляются с последующей пролиферацией на поверхность полимерных мембран, и их рост сопоставим с контролем на полистирольных планшетах.

## 6.2. Гемосовместимые свойства ПОА

Одной из ключевых задач применительно к новым биоматериалам является доказательство их абсолютной безвредности для организма. Особые требования, как известно, предъявляются к биоматериалам, предназначенным для длительного контакта с кровью, так как гемосовместимость является наиболее важным аспектом биологической совместимости. Гемосовместимые материалы при контакте с кровью не должны вызывать тромбозов, тромбоэмболий, антигенного ответа, деструкции форменных элементов крови и белков плазмы (Бисовместимость, 1999). Индикатором гемосовместимости биоматериалов служит состояние системы гемостаза (Севастьянов с соавт., 1987; Zinner et al., 1998), которое можно оценить по таким показателям, как морфология адгезированных тромбоцитов (Васин с соавт., 1998), активация комплемента (Sevastianov and Tseytina, 1984), высвобождению моноцитами цитокинина (Zinner et al., 1997) и

др. В отношении полиоксиалканоатов, вопрос о гемовосметимости должным образом в литературе не освещен.

В работе В. И. Севастьянова с сотрудниками (Севастьянов с соавт., 2001; Sevastianov et al., 2003) выполнено исследование возможности получения образцов ПОА, пригодных для контакта с кровью, и предпринята попытка идентификации примесей, способных активировать системы гемостаза (Sevastianov et al., 2002). Результаты исследования гемосовместимых свойств полимерных пленок, полученных из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, включающие определение относительного количества и морфологии адгезированных на поверхности полимерных пленок тромбоцитов, активации свертывающей системы крови и системы комплемента, представлена на рис. 6.3–6.7 и таблицах 6.3–6.6.

Количество и морфология тромбоцитов, адгезированных на поверхности пленок из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, изучена методом сканирующей электронной микроскопии. По степени морфологических изменений адгезированные тромбоциты были разбиты на четыре класса (рис. 6.3). Основными параметрами для характеристики процесса взаимодействия тромбоцитов с поверхностью материала служили: 1) общее количество тромбоцитов, адгезированных на поверхность исследуемого материала (относительно контрольного материала); 2) количество клеток каждого из указанных выше классов (относительно контрольного материала); 3) морфология одиночных клеток. Для каждого образца суммировали количество клеток по всем полям и вычисляли относительный показатель адгезированных тромбоцитов (ОПАТ) по формуле

$$\text{ОПАТ} = N_{\text{обр}}/N_{\text{КОНТР}},$$

где  $N_{\text{обр}}$  и  $N_{\text{КОНТР}}$  – количество клеток на образце и контроле (полиэтилене, ПЭ), соответственно. Значения ОПАТ вычисляют и для каждого класса тромбоцитов  $\text{ОПАТ}_i$  ( $i = 1, 2, 3, 4$ ).

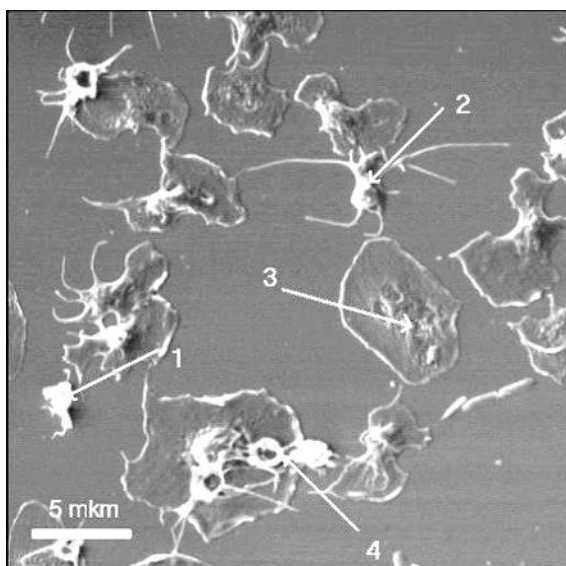


Рис. 6.3. СЕМ фотографии адгезированных клеток на пленках из полиэтилена низкого давления: 1 – неактивированные клетки (не деформированные) без признаков расплывания и псевдоподий; 2 – клетки с псевдоподиями (активированные тромбоциты с явно выраженными псевдоподиями); 3 – полностью расплывшие тромбоциты; 4 – агрегаты (Sevaianov, 2002).



Существенных различий в морфологии адгезированных тромбоцитов на поверхности пленок из образцов гомогенного ПОб, а также из сополимеров оксибутирата с оксивалератом не обнаружено (рис. 6.4). Результаты количественного анализа адгезии тромбоцитов на поверхности полимерных пленок (вычисленные значения  $ОПАТ_i$  для каждого из полимеров) представлены на рис. 6.5.

Суммарное количество клеток, адгезированных на поверхности ПОб, сопоставимо с контролем и несколько ниже на образцах ПОб-со-ПОВ. В целом количество неактивированных тромбоцитов в 1.5–1.7 раза выше на пленках из ПОА обоих типов, по сравнению с контролем – ПЕ (полиэтилен низкого давления). При этом доля распластанных клеток также существенно ниже на поверхности пленок ПОб и ПОб-со-ПОВ по сравнению с контрольным полиэтиленом. Количество агрегатов убывало с увеличением содержания гидроксивалерата в полимере.

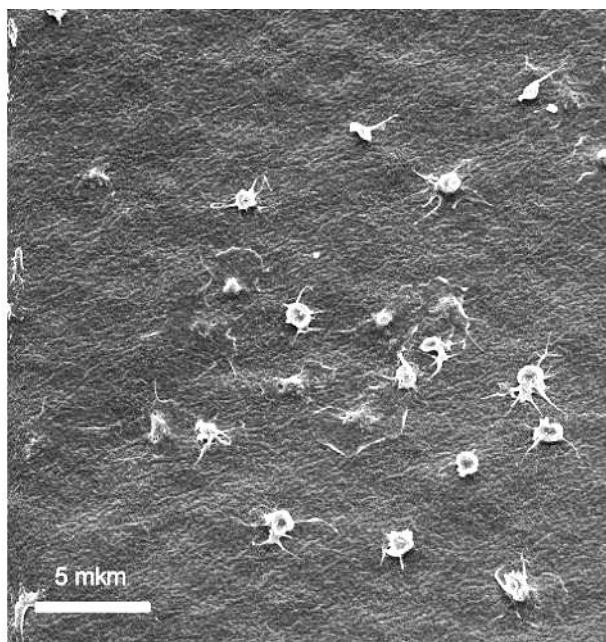


Рис. 6.4. Характерная картина тромбоцитов, адгезированных на поверхности пленок из ПОА (Sevastianov et al., 2003).

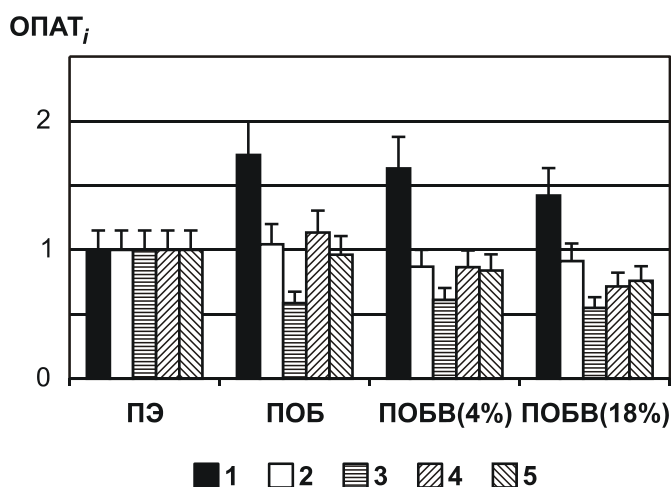


Рис. 6.5. Значения  $ОПАТ_i$  для четырех классов тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимерных пленок из ПОб, ПОбВ и ПЕ (контроль):  
 1 – неактивированные клетки;  
 2 – клетки с псевдоподиями;  
 3 – полностью распластанные тромбоциты;  
 4 – агрегаты;  
 5 – сумма клеток (Севастьянов с соавт., 2001).

Из полученных данных следует, что все исследуемые образцы ПОА обладают хорошей гемосовместимостью на стадии клеточного ответа (реакции тромбоцитов на чужеродную поверхность). По данному показателю сополимерный материал более пригоден для контакта с тромбоцитами. В целом, поверхность полимерных пленок из ПОА оказывала на тромбоциты меньшее активирующее воздействие, чем использованный в качестве контроля полиэтилен низкого давления.

Данные по активации свертывающей системы крови, индуцированной поверхностью ПОА-пленок (в значениях относительного времени рекальцификации плазмы) и системы комплемента (в значениях абсолютной  $(k_{инд})^{обр}$  и относительной  $(K_{инд})$  констант скоростей, суммированы в таблицах 6.3–6.4.

Для образцов из ПОБ-со-ПОВ время рекальцификации было сопоставимо с реакцией плазмы, однако для полиоксибутирата выявлено значительное превышение показателя, которое по величине сопоставимо с гепаринизированными материалами (Севастьянов с соавт., 1987). По-видимому, использованная технология очистки полимеров не исключает присутствие в образцах примеси биологически активные веществ, например липополисахаридов клеточных стенок грам-отрицательных бактерий (ЛПС), которые способны ингибировать каскадный путь активации свертывания крови.

**Таблица 6.3**

**Абсолютные (ВРП) и относительные (ОВРП) значения времени рекальцификации плазмы для образцов ПОА (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Образец   | ВРП, с                  | ОВРП            |
|---|-------------------------|-----------------|
| Исходная плазма                                   | $321 \pm 26 (n = 6)$    | $1.0 \pm 0.1$   |
| ПОБ   | $919 \pm 100 (n = 4)^*$ | $2.9 \pm 0.4$   |
| ПО-со-ПОВ<br>(включение оксивалерата – 4 мол. %)  | $296 \pm 4 (n = 4)$     | $0.90 \pm 0.07$ |
| ПО-со-ПОВ<br>(включение оксивалерата – 18 мол. %) | $359 \pm 29 (n = 4)$    | $1.1 \pm 0.1$   |

**Таблица 6.4**

**Значения абсолютной  $(k_{инд})^{обр}$  и относительной  $(K_{инд})$  констант скоростей активации системы комплемента, индуцированной поверхностью ПОА (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Образец  | $(k_{инд})^{обр} \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$<br>$\pm \sigma (n = 3)$ | $(K_{инд})$<br>$\pm \sigma (n = 3)$ |
|--|--|-------------------------------------|
| Купрофан (контроль 1)                          | $(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-6}$   | $1.00 \pm 0.08$                     |
| ПЭ (контроль 2)                                | $(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$   | $0.76 \pm 0.08$                     |
| ПОБ  | $(7.5 \pm 0.5) \times 10^{-6}$   | $4.4 \pm 0.4$                       |
| ПО-со-ПОВ<br>(включение валерата – 4 мол. %)   | $(5.3 \pm 0.4) \times 10^{-6}$   | $3.1 \pm 0.3$                       |
| ПОБ-со-ПОВ<br>(включение валерата – 18 мол. %) | $(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-6}$   | $2.5 \pm 0.2$                       |

Предположение о наличии в образцах ПОА биологически активных веществ за счет остаточных концентраций макромолекул бактериальных клеток подтвердилось обнаруженным комплемент-активирующим действием полимеров (таблица 6.4). Все тестируемые образцы показали высокую активирующую способность относительно системы комплемента, существенно превышающую пороговое значение константы скорости активации системы комплемента (1.5). Наибольшее значение  $K_{инд}$  получено для ПОБ, наименьшее – для ПОБ-со-ПОВ с 18 мол. % оксивалерата.

Эти результаты свидетельствуют о негативном воздействии поверхности пленок из ПОА на ферментные системы крови. Возник вопрос, в результате какого фактора это происходит? Имеет ли место активация ферментных систем крови собственно полимерным материалом или нежелательные реакции есть следствие воздействия биологически активных веществ биомассы бактерий, присутствующих в образцах?

С целью поиска причины эффекта активации ферментных систем крови ПОА проведен детальный анализ химического состава образцов. В материале не обнаружено посторонних примесей белковой и углеводной природы, даже в следовых количествах. Учитывая это, а также принадлежность продуцента к грам-отрицательным прокариотам, поиск был сосредоточен на компонентах мембран липидной природы. Известно, что образцы ПОА, синтезированные грам-отрицательными бактериями, после выделения из биомассы могут содержать в своем составе эндотоксины ЛПС, которые вызывают воспалительные, пирогенные и другие реакции (Martin and Williams, 2002). На примере двух продуцентов (природного штамма *R. eutrophia* и рекомбинантного штамма *E. coli*) показано, что в зависимости от способа экстракции уровень эндотоксинов в полимере можно существенно снизить, до 20 U/g и менее. Это позволяет получать образцы материала, пригодные для медицинских приложений с допустимым уровнем эндотоксинов (Lee et al., 1999).

Компонентом липидной составляющей ЛПС грам-отрицательных бактерий является липид А, в составе которого обнаружены  $\beta$ -гидроксикислоты с длиной цепи от 12 до 18 атомов углерода, а также ряд насыщенных жирных кислот (ЖК) (Ritschel et al., 1988; Raitz et al., 1991). В связи с тем, что спектр ЖК ЛПС достаточно специфичен для отдельных групп бактерий, воздействие эндотоксина на организм может быть различным. Поэтому была предпринята попытка обнаружения в исследуемых образцах полимеров эндотоксинов бактериального происхождения по составу жирных кислот.

В работе (Sevastianov et al., 2003) установлено, что жирнокислотный состав ЛПС исследуемого в данной работе продуцента ПОА

– бактерий *R. eutropha* B5786, характеризуется высоким содержанием насыщенных C<sub>14:0</sub> (более 20 мол. %), C<sub>16:0</sub> (10 мол. %) и β-гидроксикислот, представленных β-ОН-C<sub>14:0</sub> (> 50 мол. %), β-ОН-C<sub>12:0</sub> (0.2 мол. %), β-ОН-C<sub>16:0</sub> (0.2 мол. %), β-ОН-C<sub>18:0</sub> (0.5 мол. %).

Действительно, в тестируемых образцах ПОА методом хромато-масс-спектрометрии было выявлено присутствие длинноцепочечных ЖК. Суммарная концентрация жирных кислот в полимере составляла от десятых долей до единиц (2–3) мол. %. При этом до 70 % этой величины приходилось на долю кислоты C<sub>16:0</sub>. Из длинноцепочечных гидроксикислот обнаружена только β-ОН-C<sub>14:0</sub>, доля которой не превышала 0.06 мол. % (рис. 6.6). Эти данные могут свидетельствовать о присутствии в образцах ПОА эндотоксинов клеточной стенки бактерий.

В этой связи используемая схема экстракции полимеров из бактериальной биомассы и очистки была модифицирована. В технологическую цепь включена дополнительная процедура перерастворения полимера в хлороформе с последующей экстракцией и дополнительной очисткой. Это позволило получить образцы полимеров, не содержащие длинноцепочечных ЖК (рис. 6.7).

Результаты последующего тестирования очищенных образцов полимеров (с 15 мол. % оксивалерата), не содержащих микропримесей насыщенных и длинноцепочечных гидроксикислот, представлены в таблицах 6.5–6.6.

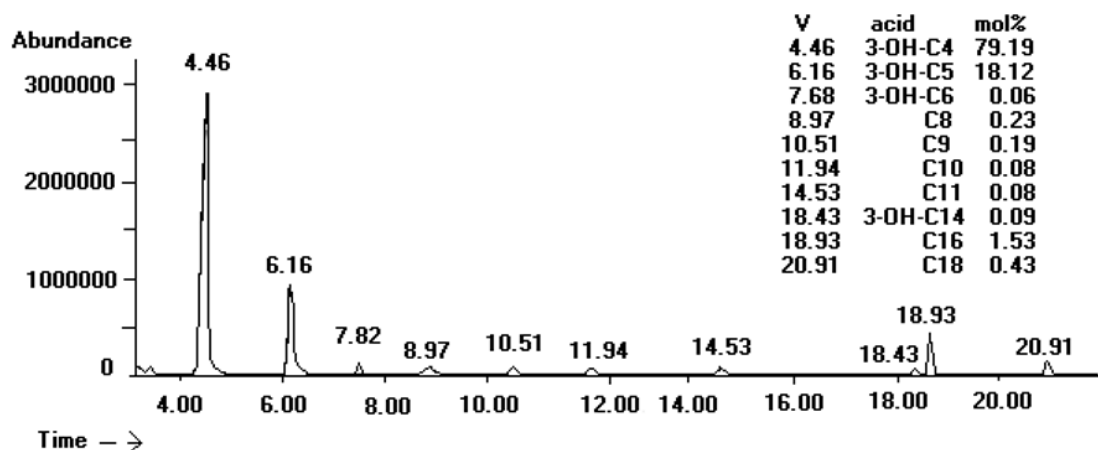


Рис. 6.6. Хроматограмма образца ПОБ-со-ПОВ (соотношение мономеров C<sub>4</sub>:C<sub>5</sub> = 79.19:18.12 мол. %) суммарное содержание примеси оксикислот C<sub>6</sub>–C<sub>18</sub> 2.67 мол. % (Sevastianov et al., 2003).

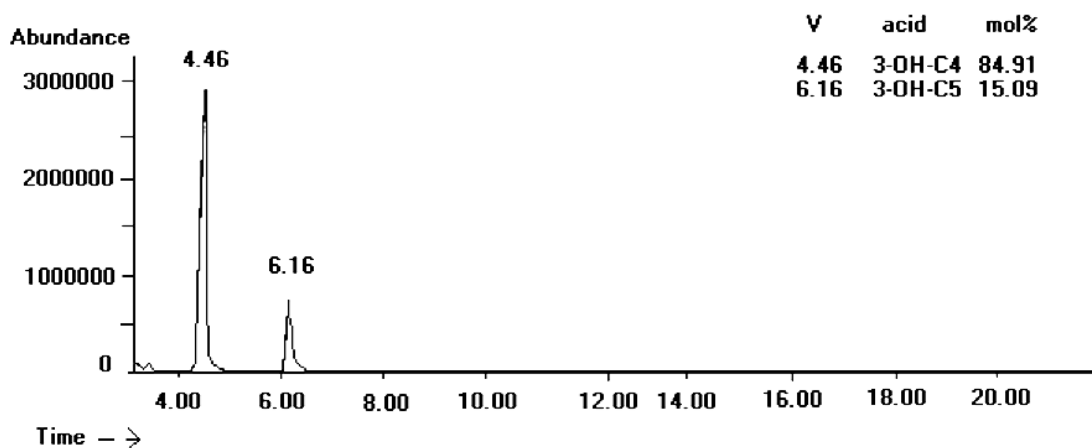


Рис. 6.7. Хроматограмма образца ПОБ/ПОВ после дополнительной очистки; соотношение C<sub>4</sub>:C<sub>5</sub> = 84.91:15.09 мол. % (Sevastianov et al., 2003).

**Таблица 6.5**

**Абсолютные (ВРП) и относительные (ОВРП) значения времени рекальцификации плазмы для дополнительно очищенных образцов ПОА (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Образец                                      | ВРП, с          | ОВРП        |
|--|-----------------|-------------|
| Исходная плазма                              | 201 ± 7 (n = 6) | 1.0 ± 0.1   |
| ПОБ  | 136 ± 1 (n = 4) | 0.68 ± 0.05 |
| ПОБ-со-ПОВ (15 мол. %) (однократная очистка) | 153 ± 2 (n = 4) | 0.80 ± 0.06 |
| ПОБ-со-ПОВ (15 мол. %) (двукратная очистка)  | 160 ± 3 (n = 4) | 0.76 ± 0.06 |

**Таблица 6.6**

**Значения абсолютной ( $k_{инд}^{обр}$ ) и относительной ( $K_{инд}$ ) констант скоростей активации системы компонента, индуцированной поверхностью очищенных образцов ПОА (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Образец                                     | $(k_{инд}^{обр}) \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1} \pm \sigma (n = 3)$ | $(K_{инд}) \pm \sigma (n = 3)$ |
|---|---|--------------------------------|
| Купрофан (контроль 1)                       | $(2.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$                                      | 1.00 ± 0.08                    |
| ПЭ (контроль 2)                             | $(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-6}$                                      | 0.84 ± 0.09                    |
| ПОБ   | $(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-6}$                                      | 0.92 ± 0.10                    |
| ПО-со-ПОВ (15 мол. %) (однократная очистка) | $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$                                      | 0.80 ± 0.07                    |
| ПОБ-со-ПОВ (15 мол. %) (двукратная очистка) | $(1.10 \pm 0.08) \times 10^{-6}$                                    | 0.44 ± 0.05                    |

Из сравнения данных таблиц 6.3–6.4 и с аналогичными данными таблиц 6.5–6.6 видно, что дополнительной очисткой удалось полностью устранить выявленный отрицательный, с точки зрения гемосовместимости, эффект активации ферментных систем крови для очищенных по ранее принятой схеме образцов как ПОБ, так и ПОБ-со-ПОВ. Следует отметить, что дополнительная двукратная процедура перерастворения и очистки ПОБ-со-ПОВ не изменила значение ОВРП образцов (таблица 6.5), но существенно снизила индуцированную поверхностью сополимера активацию системы комплемента (таблица 6.6).

Эти результаты показали, что фактором, активирующим ферментные системы крови являются микропримеси длинноцепочечных жирных кислот – компонентов ЛПС клеточных стенок бактерий *R. eutropha* – продуцента исследуемых ПОА. Дополнительно очищенные образцы ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, не содержащие данных примесей, в реакции активации системы комплемента показали себя лучше с точки зрения гемосовместимости по сравнению с взятыми в качестве контроля купрофаном и полиэтиленом.

Таким образом, специальная технология очистки позволяет получать образцы ПОА, свободные от длинноцепочечных гидроксикислот – компонентов клеточной стенки, 99.9 % чистоты, пригодные для контакта с кровью.

### **6.3. Результаты исследования биосовместимости ПОА *in vivo***

Результаты исследований медико-биологических свойств полиоксиалканоатов на экспериментальных животных, представленные в литературе, немногочисленны и посвящены главным образом выявлению токсичности материала. Развитие тканевой инженерии – нового направления трансплантологии и биоматериаловедения явилось сильным стимулом для медико-биологических исследований ПОА.

Полиоксибутират и его смеси с полиэтиленом изучены в качестве заменителя кожи в сравнении с полилактидами при имплантации лабораторным крысам на длительное время (Beumer et al., 1978). Отмечено наличие воспалительных реакций тканей в первый период, однако далее, на фоне формирующегося фиброза происходила деградация полимеров, и воспалительные реакции прекращались. Примерно через две недели после имплантации во всех исследованных полимерных матриксах наблюдали формирование пор и прорастание их новыми клетками. Отрицательного влияния ПОБ на структуру и морфологию тканей внутренних органов экспериментальных животных не обнаружено.

В работе (Harrison et al., 1994) изучены свойства и кинетика деградации ПОб и его смесей с полиэтиленом при имплантации крысам на срок до 52 недель. Макро- и микроскопия тканей показала наличие неспецифического воспаления тканей в раннем периоде (первые две недели), при этом отмечено, что имплантаты были достаточно прочными и не влияли на пролиферативную активность клеток в окружающих тканях. При имплантации пленочных образцов композита «полиоксибутират-полиуретаны» под кожу лабораторным животным в области брюшины не обнаружено признаков перерождения тканей и образования опухолей. Через год толщина капсулы вокруг имплантатов составляла у разных животных от 60 до 250 мкм (Saad et al., 1997b).

Однако в одной из последних работ в ходе исследования ПОб применительно к сердечно-сосудистой хирургии получены отрицательные результаты (Unverdorben et al., 2002). Стенты, изготовленные из ПОб и имплантированные в подвздошную артерию кроликам, вызывали выраженную воспалительную реакцию, повышенную продукцию коллагена, а также сужение и повреждение стенок сосудов.

Профессором Гоголевски с сотрудниками (Gogolewski et al., 1993a, b) изучена реакция тканей на ПОб и ПОб-со-ПОб *in vivo* в сравнении с полилактидами при имплантации внутрибрюшинно мышам. Вокруг полимерных имплантатов отмечена типичная реакция тканей с участием мононуклеарных макрофагов, фагоцитирующих ПОА, и формирование фиброзной капсулы. Однако воспалительная реакция тканей проявлялась в разной степени в зависимости от типа материала. При использовании полилактидов она исчезала к исходу первого месяца после операции, а у животных, которым были имплантированы ПОб и ПОб-со-ПОб, воспалительные реакции сохранялись в течение трех месяцев. При этом наличие оксивалерата усиливало воспаление. На более поздних сроках (от 3 до 6 месяцев после имплантации) негативные проявления воздействия оксивалерата исчезали, и состояние тканей было одинаковым во всех группах животных. Негативных реакций вокруг полимерных имплантатов из ПОА в виде абсцессов и некрозов тканей не отмечено. Близкие результаты получены при имплантации сополимеров ПО-со-ПОб с различным включением оксивалерата (7, 14 и 22 мол. %) внутримышечно овцам на срок до 90 недель (Charut et al., 1995 a,b). Неблагоприятных реакций в виде некрозов или абсцессов в месте имплантатов не обнаружено. В течение первой послеоперационной недели зарегистрировано небольшое воспаление тканей вокруг имплантатов с участием нейтрофилов, лейкоцитов, макрофагов и фибробластов и начало формирования фиброзной капсулы. Воспалительная реакция была более значительной на имплантаты, содержащие 14 и 22 мол. % оксивалерата. К трем месяцам после имплантации воспаление тканей значительно уменьшилось, сформированная плотная капсула была

представлена высоко организованными мышечными волокнами и хорошо васкуляризированной. На более поздних сроках, спустя полгода и далее после имплантации, в капсуле и близлежащих тканях отмечено много жировых клеток. На всех сроках исследования в зависимости от доли включения оксивалерата в ответе тканей, характере и длительности тех или иных реакций отмечены некоторые различия, усиливающиеся с ростом включения оксивалерата.

Однако в работах других авторов (Borkenhagen et al., 1998) негативного влияния оксивалерата *in vivo* не обнаружено. Были исследованы сополимеры ПОб-со-ПОВ с различными включениями оксивалерата в качестве нервопроводящих каналов на лабораторных животных в ходе четырехмесячного эксперимента. Зависимости процесса регенерации аксона от химического состава имплантата не выявлено. Отмеченные незначительные воспалительные реакции не влияли на регенерацию тканей, а наличие оксивалерата не усиливало постоперационного воспаления. В целом, результаты по регенерации нервопроводящих каналов, полученные при использовании сополимера ПОб-со-ПОВ, не отличались от таковых при исследовании ПОб-имплантатов (Nazari et al., 1999).

Таким образом, однозначного ответа на вопрос о биологической инертности сополимерного материала по сравнению с полиоксибутиратом на сегодня нет. Нельзя не отметить, однако, что воспалительные и другие нежелательные реакции при испытаниях новых биоматериалов и конструкций могут быть обусловлены не только составом, формой изделия и местом имплантации, но в значительной мере химической чистотой материала. Например, в работе (Tang et al., 1999) в ходе исследования тканевой реакции крыс, которым был имплантирован полиоксибутират, было установлено, что выщелачиваемые в ходе деструкции полимера примеси, в том числе низкомолекулярные фракции полиоксибутирата, могут быть в значительной мере ответственными за развитие воспаления и, в частности, повышенное отложение коллагена.

### **6.3.1. Биологическое воздействие ПОА *in vivo***

Сравнительное исследование биологической совместимости полиоксиалканоатов двух типов, гомогенного ПОб и сополимеров ПОб-со-ПОВ, выполнено в серии острых и хроническом экспериментах на лабораторных животных с использованием образцов ПОА, синтезированных *Ralstonia eutropha* В 5786 (Севастьянов с соавт., 2001; Шишацкая с соавт., 2002а–г; к; Шишацкая, 2003; Volova et al., 2003).

Определение раздражающего действия водных вытяжек ПОб и ПОб-со-ПОВ с различным включением оксивалерата (4 и 18 мол. %), выполненное на белых мышах линии Balb/c в виде накожных аппликаций и при введении проб в конъюнктивальную полость глаза кроликам, показало отсутствие раздражающего эффекта в обоих вариан-



тах. На месте кожных аппликаций у опытных животных не отмечено явлений гиперемии, отека, сухости, шелушения и других реакций по сравнению с контролем. При введении вытяжек ПОА в конъюнктивальную полость животным раздражающее действие на слизистые отсутствовало. Аллергической реакции немедленного типа у животных при этом также не наблюдали (Севастьянов с соавт., 2001).

Сенсибилизирующее действие ПОА определяли по реакции дегрануляции тучных клеток лабораторных крыс (по 5 животных в каждой группе), вводя в наружную поверхность уха 0,02 мл исследуемых вытяжек. На третий день животным проводили 7 накожных аппликаций по 0,5 мл вытяжки на выстриженные участки кожи бока размером 1×1 см. Контрольным животным проводили аппликации модельной среды в том же режиме. Через сутки после последней аппликации проводили провокационную внутрикожную пробу 0,02 мл свежеприготовленной вытяжки в противоположную аппликациям бок каждого животного. Ответную реакцию наблюдали через 15 мин., 24 и 48 ч. По стандартной методике определяли образование комплекса антиген-антитело. Препараты микроскопировали под большим увеличением, считая тучные клетки (клетки-мишени), подвергшиеся дегрануляции, и нормальные.

Во всех экспериментальных группах животных, сенсибилизированных по вышеописанной методике, дегрануляция тучных клеток составила менее 10 % относительно контроля. Это позволяет сделать вывод об отсутствии сенсибилизирующего эффекта испытуемых образцов.

Далее авторами было исследовано общетоксическое действие ПОБ и ПОБ-со-ПОВ в виде вытяжек в остром опыте (7 суток) на белых мышах линии Balb/c (общее число животных 28). Животным однократно внутрибрюшинно вводили вытяжки ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (включение оксивалерата 15 мол. %) и наблюдали в течение 7 суток. Положительному контролю вводили физиологический раствор, отрицательным контролем служили интактные животные. Оценивали общее состояние и поведение животных, массу тела и внутренних органов и макроскопию внутренних органов (см. таблицы 6.7–6.9).

Внешних проявлений интоксикации у животных после введения вытяжек в течение наблюдаемого периода не выявлено. Поведение мышей в опыте не отличалось от контрольных групп. Отклонений в массе тела, а также массе внутренних органов у экспериментальных животных относительно контроля не зафиксировано (таблица 6.7). Макроскопические исследования внутренних органов животных через 7 дней от начала эксперимента патологических изменений не выявили.

Анализ морфологического состава периферической крови мышей в контрольных и опытных группах показал, что колебания концентрации эритроцитов и лейкоцитов были в пределах физиологических величин (таблица 6.8). Достоверных сдвигов в лейкоцитарной формуле крови животных, получивших вытяжки полимеров, также не выявлено.

**Таблица 6.7**

**Показатели общетоксического действия водных вытяжек ПОАв опыте на белых мышах ( $M^* \pm m$ ) (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Показатель         | 1 группа интактный контроль | 2 группа положительный контроль | 3 группа ПОБ    | 4 группа ПОБ/ПОВ |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|
| Масса тела (г):    |                             |                                 |                 |                  |
| исходная           | 21.20 ± 0.14*               | 22.24 ± 0.13                    | 23.54 ± 0.20*** | 23.60 ± 0.19***  |
| конец опыта        | 24.10 ± 0.32                | 25.07 ± 0.45                    | 26.33 ± 0.36    | 26.10 ± 0.39     |
| Масса органов (г): |                             |                                 |                 |                  |
| печень             | 1.19 ± 0.04                 | 1.20 ± 0.03                     | 1.24 ± 0.05     | 1.21 ± 0.04      |
| селезенка          | 0.15 ± 0.01                 | 0.14 ± 0.01                     | 0.15 ± 0.00     | 0.15 ± 0.01      |
| почки              | 0.33 ± 0.02                 | 0.34 ± 0.01                     | 0.34 ± 0.03     | 0.35 ± 0.02      |
| легкие             | 0.20 ± 0.02                 | 0.20 ± 0.02                     | 0.21 ± 0.02     | 0.21 ± 0.02      |
| сердце             | 0.15 ± 0.00                 | 0.16 ± 0.01                     | 0.14 ± 0.00     | 0.17 ± 0.01**    |

\* – достоверное отличие между 1 и 2 группами (0.99);

\*\* – достоверное отличие между 3 и 4 группами;

\*\*\* – достоверное отличие 3 и 4 групп от 2 группы.

**Таблица 6.8**

**Морфология периферической крови мышей на 7 день после введения вытяжек ( $M^* \pm m$ ) (Севастьянов с соавт., 2001)**

| Показатель             | 1 группа (интактный контроль) | 2 группа- (положительный контроль) | 3 группа ПОБ  | 4 группа ПОБ-со-ПОВ |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------------|
| Эритроциты, $10^9$ /мл | 8.05 ± 0.03                   | 7.99 ± 0.04                        | 8.00 ± 0.03   | 7.99 ± 0.04         |
| Лейкоциты, $10^9$ /мл: | 7.65 ± 0.06                   | 7.57 ± 0.08                        | 7.57 ± 0.06   | 7.67 ± 0.07         |
| палочкоядерные, %      | 2.50 ± 0.52                   | 3.57 ± 0.48                        | 4.00 ± 0.69** | 6.71 ± 0.58***      |
| сегментоядерные, %     | 48.00 ± 2.30                  | 54.00 ± 2.14                       | 46.71 ± 2.52  | 49.00 ± 2.28        |
| лимфоциты, %           | 40.50 ± 2.42                  | 39.43 ± 1.95                       | 41.43 ± 2.53  | 37.62 ± 2.34        |
| моноциты, %            | 9.00 ± 0.67                   | 7.86 ± 0.80                        | 7.86 ± 0.46   | 6.72 ± 0.71         |

\*\* – достоверное отличие между 3 и 4 группами (0.99);

\*\*\*-достоверное отличие 3 и 4 групп от 2 группы;

В конце эксперимента перед забоем животных определяли иммуноотоксичность ПОА по фагоцитарной активности макрофагов перитонеальной жидкости испытуемых животных. Фагоцитарная активность макрофагов во всех экспериментальных группах была сопоставима с контролем. Результаты показали отсутствие иммуноотоксического эффекта со стороны ПОБ и сополимеров ПОБ-со-ПОВ

Токсикологическое и биологическое действие ПОА (в виде монофильных шовных нитей) изучено в хроническом опыте длительностью 6 мес. на белых крысах линии Вистар (Шишацкая, 2003; Ши-

шацкая с соавт., 2003 а; г; Volova et al., 2003). Экспериментальные образцы шовных нитей, изготовленные Ю. П. Некрасовым по методике (Gordeev et al., 2001) из образцов ПОА, синтезированных в Институте биофизики СО РАН, имели следующие характеристики (таблица 6.10). Перед имплантацией нити автоклавировали.

Были взяты половозрелые самки с исходной массой 180–200 г, по 18 животных в каждой группе: I – отрицательный (интактный) контроль; II – положительный контроль (хирургический шелк), III – биodeградируемая нить сравнения (кетгут), IV – экспериментальная нить ПОБ-со-ПОВ (включение оксивалерата 15 мол. %), V – экспериментальная нить ПОБ. Животным под ингаляционным наркозом (диэтиловый эфир) в асептических условиях на наружной поверхности правого бедра делали линейный продольный разрез кожи и мышцы длиной 2 см. На мышцу накладывали три одиночных узловых шва из испытуемого материала (общая длина 3.0–3.5 см), кожную рану ушивали шелком (Шишацкая с соавт., 2002 а, б, г).

Таблица 6.9

Оптическая плотность раствора с лизированными перитониальными макрофагами мышей в эксперименте ( $D_{\text{опыт}}$ ) относительно контроля ( $D_{\text{контр}}$ ) Севастьянов с соавт., 2001)

| Наименование образцов                              | $D_{\text{опыт}}/D_{\text{контр}}$ |
|--|------------------------------------|
| ПОБ  | $6.8 \pm 1.1/7.1 \pm 0.8$          |
| ПОБ-со-ПОВ<br>(включение оксивалерата – 15 мол. %) | $6.9 \pm 0.8/7.1 \pm 0.7$          |

Таблица 6.10

Характеристики экспериментальных образцов шовных нитей из ПОА ( $M^* \pm m$ ) (Волова с соавт., 2003)

| Показатель                                 | ПОБ              | ПОБ-со-/ПОВ      |
|--|------------------|------------------|
| Абсолютная разрывная нагрузка ( $F_p$ ), Н | $7.10 \pm 0.21$  | $9.40 \pm 0.19$  |
| Коэффициент вариации по нагрузке, %        | $16.4 \pm 1.82$  | $3.00 \pm 2.12$  |
| Прочность при разрыве, МПа                 | $205 \pm 31$     | $274 \pm 27$     |
| Относительное разрывное удлинение, %       | $27.80 \pm 1.02$ | $37.70 \pm 1.74$ |
| Коэффициент вариации по удлинению, %       | $12.1 \pm 1.46$  | $6.5 \pm 0.81$   |
| Модуль упругости, ГПа                      | 3.75             | 3.13             |

\*– среднее из 10 измерений

В периферической крови (забор из хвоста) с использованием общепринятых методов проводили развернутый анализ крови, определяли СОЭ, содержание гемоглобина и форменных элементов. В крови, забранной у наркотизированных животных из левого желудочка сердца, определяли биохимические показатели. С использованием серийных наборов реагентов для клинических исследований в сыворотке крови анализировали общее содержание и фракции белка, остаточный азот, мочевины, креатинин и активность ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), кислой и щелочной фосфомоноэстераз (КФ, ЩФ), аланин- и аспартаттрансфераз (АЛТ и АСТ).

Исследование лимфоидной ткани («имплантационный тест») проводили патоморфологическим анализом отпечатков паховых лимфатических узлов животных (2 и 4 недели после имплантации); анализировали строение ЛУ и соотношение популяций иммунокомпетентных клеток. В середине (8 недель) и в конце эксперимента (24 недели) проводили макро- и микроскопические исследования внутренних органов (печени, почек, сердца, селезенки и легких). Оценивали общую гистоархитектонику внутренних органов (окраска гематоксилин-эозином). Реакцию тканей на ПОА исследовали общепринятыми гистологическими методами; для этого спустя 1, 2, 4, 8, 16 и 24 недели после операции из бедренной мышцы животных иссекали фрагмент тканей с имплантатами. После фиксации в 10 % формалине материал заключали в парафин; из блоков готовили срезы толщиной 5–10 мкм. Анализировали общую реакцию ткани на имплантированные экспериментальные нити (окраска гематоксилин-эозином) и процессов развития коллагеновых волокон (окраска пикрофуксином по Ван-Гизону) в сравнении с таковыми при имплантации шелковой нити и кетгута. С использованием Image Analysis System «Carl Zeiss Jena» проводили анализ изображений и морфометрические исследования срезов.

В течение эксперимента все животные, которым были имплантированы нити из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, были здоровы и активны, равномерно прибавляли в весе. Достоверных изменений по сравнению с двумя контрольными группами обнаружено не было. Относительные массы внутренних органов у животных экспериментальных групп также не отличались от таковых в контроле. Макроскопические исследования внутренних органов у всех животных на всех сроках наблюдения отклонений не выявили (Шишацкая с соавт., 2002а; Шишацкая, 2003).

Анализ морфологического состава периферической крови в контрольных и опытных группах показал, что в основном эти показатели находились в пределах физиологической нормы и не отличались существенно у животных экспериментальных групп относительно контролей. Незначительное повышение количества лейкоцитов (от 10–11 до 12.5–13.0×10<sup>9</sup>/л) и уровня СОЭ (до 3.0–3.5) отмечены на

седьмые сутки после оперативного вмешательства у всех оперированных животных относительно интактных. Лейкоцитоз на данном сроке у животных, раны которых были ушиты кетгутом, был достоверно ( $p = 0,05$ ) выше относительно обеих экспериментальных групп и сохранялся на более поздних сроках (2 и 4 недели после операции). Достоверное повышение СОЭ отмечено только на первом наблюдаемом сроке и только у животных III и V групп относительно отрицательного контроля. Далее показатель был в границах физиологической нормы у всех животных. В лейкоцитарной формуле экспериментальных животных на всех сроках наблюдения достоверных систематических изменений не выявлено.

Биохимические исследования во всем комплексе показателей, не выявили между группами животных достоверных отклонений, выходящих за пределы физиологических величин (Шишацкая с соавт., 2002б). Анализ динамики содержания мочевины, креатинина и остаточного азота в сыворотке крови свидетельствуют об отсутствии негативного влияния имплантированных полимерных нитей на показатели азотного обмена и функцию почек животных. Содержание белка в сыворотке крови, а также его фракционный состав во всем массиве данных не выявили патологических изменений. Исключение составило достоверное падение величины «альбумины/глобулины» у всех оперированных животных (до  $0.77 \pm 0.02 - 0.81 \pm 0.01$ ) относительно интактных ( $0.89 \pm 0.01 - 0.91 \pm 0.02$ ). Однако это изменение имело место только на первом сроке наблюдения (одна неделя после операции) и отражало наличие постоперационного воспаления; далее величина была сопоставима с контролем. Динамика активности АЛТ и АСТ как показателя дезинтоксикационной функции печени была в пределах физиологической нормы у всех животных в течение всего опыта

Выраженные изменения зарегистрированы у оперированных животных в показателях активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови. В течение первых двух недель у всех оперированных животных (2–5 группы) по сравнению с интактным контролем был повышен уровень лактатдегидрогеназы. В первую неделю после операции показатель у всех оперированных животных был выше более, чем в 3–4 раза по сравнению с интактной группой. Более выраженными изменения были у животных, раны которых были ушиты кетгутом. (рис. 6.8). На 14-е сутки после операции активность ЛДГ снизилась, а через 8 недель практически сравнялась с интактным контролем.

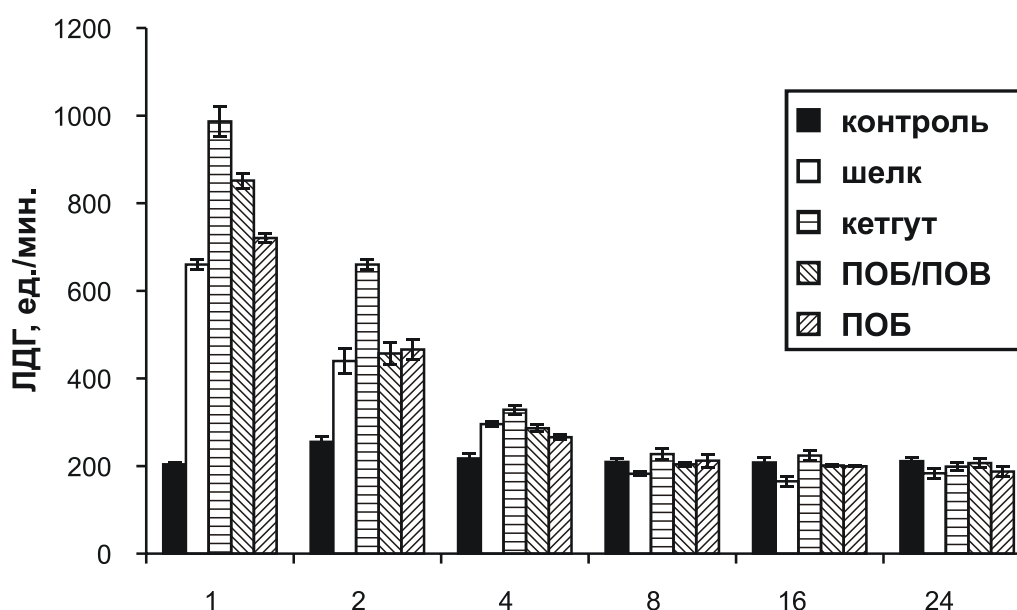


Рис. 6.8. Динамика активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) сыворотки крови крыс в хроническом эксперименте (Шишцкая с соавт., 2000 б).

Изменение активности ЛДГ отражает, как известно, биохимические изменения в тканях, имеющие место на стадии повреждения и связанные, наряду с высвобождением кислых липидов и их перекисным окислением, с активацией реакций гликолиза, которые сопровождаются накоплением в тканях молочной кислоты и ацидозом (Воспаление, 1981; Шехтер, Серов, 1995).

Для определения степени влияния имплантированных полимерных нитей на органы иммунитета и выявления возможной сенсibilизации иммунокомпетентных систем животных исследована реакция лимфоидной ткани (Шишцкая с соавт., 2000б). Проанализированы макро- и микроскопические характеристики паховых правых (регионарных по месту имплантации) и левых (отдаленных) лимфоузлов (ЛУ). Во всех группах животных через 2 и 4 недели после начала эксперимента ЛУ имели плотно-эластическую консистенцию, бобовидную форму с гладкой поверхностью. Размеры ЛУ лежали в пределах 0.15×0.18 – 0.25×0.35 см. При микроскопии рисунок ЛУ сохранен; изменений средней площади лимфоидных узелков и в соотношении между корковым веществом и паракортикальной зоной не выявлено. Достоверных систематических изменений в соотношении клеточных популяций ЛУ (анализировали малые лимфоциты, бласты, плазматические, ретикулы, митозы) у экспериментальных групп относительно контролей не выявлено. В течение всего наблюдаемого периода доминирующей популяцией ЛУ были малые лимфоциты; соотношение зрелых клеток и делящихся также не изменилось. Это

позволяет говорить об отсутствии влияния имплантированных в мышцу животных полимерных волокон на периферические органы иммунитета животных.

Микроскопические исследования внутренних органов животных через 2 и 6 месяцев от начала эксперимента патологических изменений не выявили. Гистологическая картина внутренних органов всех оперированных животных из всех групп и интактного контроля была идентичной.

Отсутствие достоверных изменений между всеми группами животных по 26 исследованным показателям (масса животных и внутренних органов; морфология и биохимия крови, морфометрические показатели реакции тканей в месте имплантации) подтверждено кластерным анализом, выполненным методом одного звена с использованием авторской программы доктора биологических наук М. И. Гладышева (рис. 6.10).

Таким образом, шовные нити из полиоксиалканоатов, имплантированные внутримышечно, не оказывали негативного влияния на физиологические, биохимические и функциональные характеристики животных, не зависимо от химического состава материала и длительности контакта с внутренней средой организма. Важно отметить, что присутствие оксивалерата в полимере в количестве 15 мол. % не влияло на постоперационное состояние животных и весь комплекс исследованных показателей.

### **6.3.2. Реакция тканей на имплантацию ПОА**

Для выявления механизма взаимодействия полимерных имплантатов с тканями организма необходимы комплексные исследования закономерностей местного регенераторного процесса собственно тканей, реакции целого организма, а также наблюдения за состоянием имплантированного материалом. Это связано с разнообразием и множественностью реакций, возникающих в системе «имплантат – ткань – организм». В отношении ПОА в настоящее время отсутствуют знания о механизме их биосовместимости и устойчивости в биологических средах при кратковременном или длительном функционировании.

Исследования взаимодействия в системе «полимерные имплантаты – ткани» включали анализ реакции и морфогенеза тканей на имплантированные нити с учетом силы и длительности воспаления, динамики образования и инволюции фиброзной капсулы и ее клеточного состава, времени развития и созревания коллагеновых волокон, а также состояния шовных нитей. Для этого была использована стандартная гистологическая и гистохимическая техника, световая и электронная микроскопия. Морфометрические исследования выполнены с применением системы обработки изображений Image

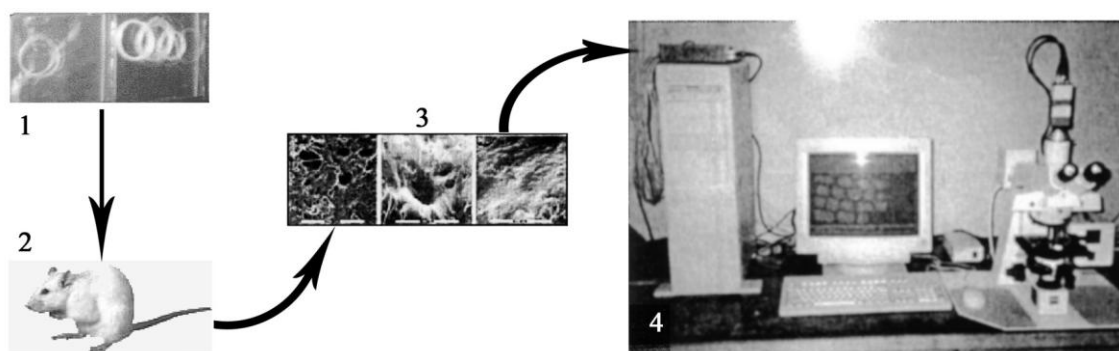


Рис. 6.9. Схема исследования реакции тканей на имплантацию ПОА:  
 1 – нити, 2 – имплантация животным, 3 – получение гистологических препаратов;  
 4 – морфометрические исследования с использованием системы обработки изображений Image Analysis System «Carl Zeiss Jena».

Analysis System «Carl Zeiss Jena» (рис. 6.9). Определяли толщину (ТК) фиброзной капсулы (ФК) – показатель интенсивности соединительно-тканной реакции в зоне имплантации и рядность фибробластов (РФ) – показатель активности продукционной реакции в месте имплантации (Шишацкая с соавт., 2002г, д).

В ходе эксперимента было зафиксировано, что шовные нити из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, аналогично шелку и кетгуту, надежно удерживали края мышечно-фасциальных разрезов в течение постоперационного периода. Заживление ран у животных в экспериментальных группах, аналогично животным в контроле, происходило первичным натяжением. Ни у одного животного не обнаружено явлений отторжения нитей, расхождения швов и других отрицательных проявлений. Реакция тканей на оперативное вмешательство с последующей имплантацией нитей из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ протекала по схеме, характерной для раневого процесса и реакции на инородное тело, и включала стадии посттравматического воспаления, новообразования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца (рис. 6.11). Однако в ответе тканей выявлены отличия между исследуемыми шовными нитями из ПОА и традиционным шовным материалом. Эти различия были выявлены на стадии посттравматического воспаления тканей и образования и реорганизации рубца (таблица 6.10).



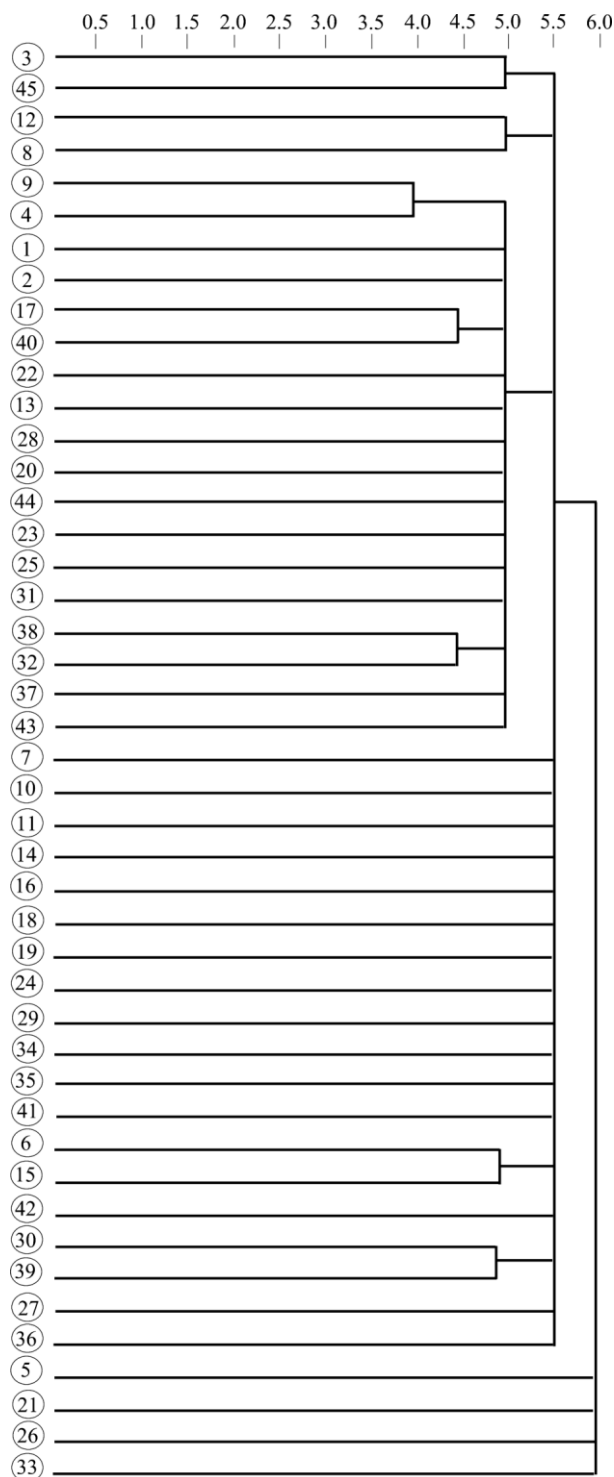


Рис. 6.10. Результаты кластерного анализа:  
 1, 2, 3 и далее до 45 – животные в экспериментальных группах:  
 1–9 – интактные, группа I, 10–18 – шелк, группа II, 19–27 – кетгут, группа IIIcatgut,  
 28–36 – нить ПОБ-со-ПОВ, группа IV, 37–45 – нить ПОБ, группа V.  
 По вертикальной оси – евклидовы расстояния в 26–ти мерном пространстве признаков  
 (масса крыс и внутренних органов, морфология и биохимия крови).

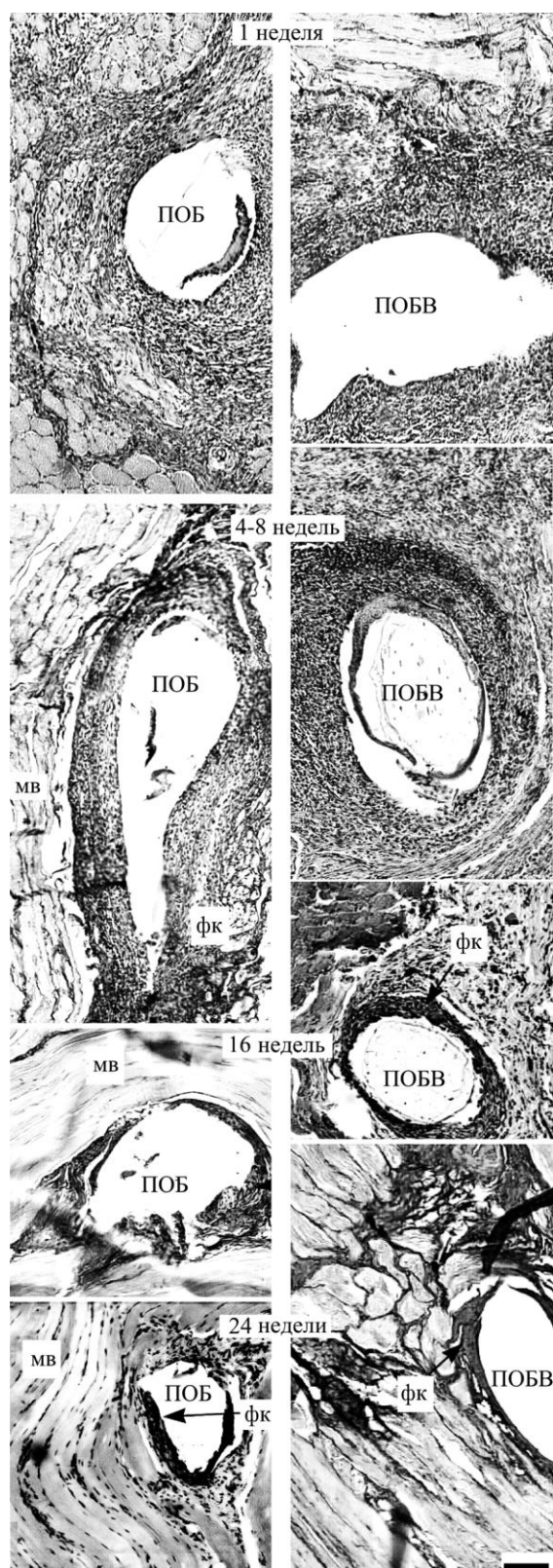


Рис. 6.11. Морфология тканей вокруг ПОБ и ПОБ-со-ПОВ нитей после имплантации. Гематоксилин-эозин. Обозначения: П – полимерная нить, ФК – фиброзная капсула, МВ – мышечные волокна. Маркер – 0,01 мм (Шишацкая с соавт., 2002г, д).

Таблица 6.10

Морфометрические показатели реакции тканей на имплантацию шовного материала разного происхождения ( $M^* \pm m$ ) (Шишацкая с соавт., 2002г)

| Шовный материал | Время, недели | Толщина капсулы (ТК), мкм | Рядность фибробластов (РФ) | Количество макрофагов (поле/зр) |
|-----------------|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| ПОБ             | 1             | –                         | –                          | 2,64 ± 0,31                     |
|                 | 2             | 116,98 ± 6,46             | 9,07 ± 0,58                | 6,36 ± 0,42                     |
|                 | 4             | 172,23 ± 13,64            | 10,64 ± 0,48               | 11,50 ± 0,85                    |
|                 | 8             | 161,20 ± 5,93             | 9,50 ± 0,57                | 13,56 ± 0,87                    |
|                 | 16            | 54,09 ± 3,28              | 4,64 ± 0,37                | 11,93 ± 0,98                    |
|                 | 24            | 48,02 ± 5,25              | 3,50 ± 0,32                | 10,50 ± 0,85                    |
| ПОБ/ПОВ         | 1             | –                         | –                          | 3,14 ± 0,32                     |
|                 | 2             | 130,86 ± 3,43             | 9,28 ± 0,76                | 5,50 ± 0,40                     |
|                 | 4             | 169,67 ± 5,98             | 11,07 ± 0,65               | 10,79 ± 0,90                    |
|                 | 8             | 158,08 ± 4,37             | 10,57 ± 0,67               | 12,79 ± 0,74                    |
|                 | 16            | 43,71 ± 3,11              | 3,36 ± 0,37                | 11,93 ± 0,84                    |
|                 | 24            | 33,73 ± 2,05              | 2,57 ± 0,27                | 12,64 ± 0,93                    |
| Шелк            | 1             | –                         | –                          | 1,00 ± 0,19                     |
|                 | 2             | 126,99 ± 2,70             | 13,29 ± 0,75               | 1,36 ± 0,14                     |
|                 | 4             | 169,87 ± 13,45            | 10,64 ± 0,48               | 1,43 ± 0,19                     |
|                 | 8             | 173,17 ± 5,46             | 11,43 ± 0,81               | 1,14 ± 0,19                     |
|                 | 16            | 125,49 ± 2,63             | 10,79 ± 0,63               | 1,29 ± 0,21                     |
|                 | 24            | 132,54 ± 3,84             | 9,71 ± 0,37                | 1,21 ± 0,23                     |
| Кетгут          | 1             | –                         | –                          | 5,21 ± 0,66                     |
|                 | 2             | 204,99 ± 17,53            | 21,00 ± 0,84               | 4,00 ± 0,65                     |
|                 | 4             | 422,25 ± 6,51             | 38,79 ± 1,01               | 5,64 ± 0,70                     |
|                 | 8             | 514,21 ± 12,01            | 46,29 ± 1,66               | 2,14 ± 0,45                     |
|                 | 16            | 342,00 ± 9,68             | 21,76 ± 0,84               | 2,43 ± 0,45                     |
|                 | 24            | 272,14 ± 4,11             | 20,86 ± 1,19               | 1,14 ± 0,22                     |

\* – среднее из 15 измерений

Для анализа биохимических перестроек, сопровождающих морфологические изменения в тканях после операции и имплантации нитей, исследованы в динамике активность фосфомоноэстераз, кинесой (КФ) (рис. 6.12–6.13) и щелочной фосфатаз (ЩФ) (рис. 6.14–6.15), которые наиболее ярко реагируют на повреждение тканей (Salthouse, 1976). ЩФ, присутствующая в основном в нейтрофилах, является показателем процессов воспаления, а также неоваскуляризации (Музыкант, Дудникова, 1975; Salthouse, Matlaga, 1975); КФ макрофагов и гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) служит показателем интенсивности биодеструкции полимерных материалов (Пхакадзе с соавт., 1982; Burpee et al., 1978).

Активность КФ в сыворотке крови у всех оперированных животных была выше по сравнению с интактным контролем (рис. 6.12). На всех сроках наблюдения активность КФ в III (кетгут), IV (ПОБ-со-ПОВ) и V группах (ПОБ) была выше, чем у животных II группы (шелк). Между экспериментальными (IV и V группами), начиная с 4 недели, различия активности КФ были достоверными; при этом активность фермента у животных, которым были имплантированы нити из ПОБ-со-ПОВ, была выше. Это согласуется с результатами по биодеградации ПОА в биологических средах, где ПОБ-со-ПОВ деградируют более активно по сравнению с ПОБ.

Активность ЩФ в первые две недели у всех оперированных животных была существенно (в 2.0–2.5 раза) выше относительно интактных животных (рис. 6.14). Внутри групп между оперированными животными самые высокие значения ЩФ, достоверно отличающиеся от положительного контроля (шелк) и экспериментальных групп, зафиксированы у животных, раны которых были ушиты кетгутом. Повышение активности ЩФ у этой группы животных наблюдали на более поздних сроках (до 8 недель), в то время, как у всех других оперированных животных значения ЩФ нормализовались к 4 неделе. Между IV и V экспериментальными группами по данному показателю достоверные отличия зафиксированы только на 2 неделю после операции.

Результаты биохимических и гистохимических исследований согласуются между собой (Рис. 6.12–6.15).

На 7 день после операции на фоне воспаления в области операции и имплантации нитей из обоих типов ПОА было отмечено значительное повышение уровня ЩФ в прилегающих тканях (рис. 6.15а). Аналогичная реакция отмечена вокруг шелка и существенно более выраженная – в месте имплантации кетгута. Активность КФ в этот период в тканях, прилегающих к имплантатам всех типов, в т. ч. из ПОБ-со-ПОВ, гистохимически существенно не проявлялась (рис. 6.13а). Это согласуется с невысоким уровнем макрофагов в тканях в этот период (2–3 п/зр) (таблица 6.10).

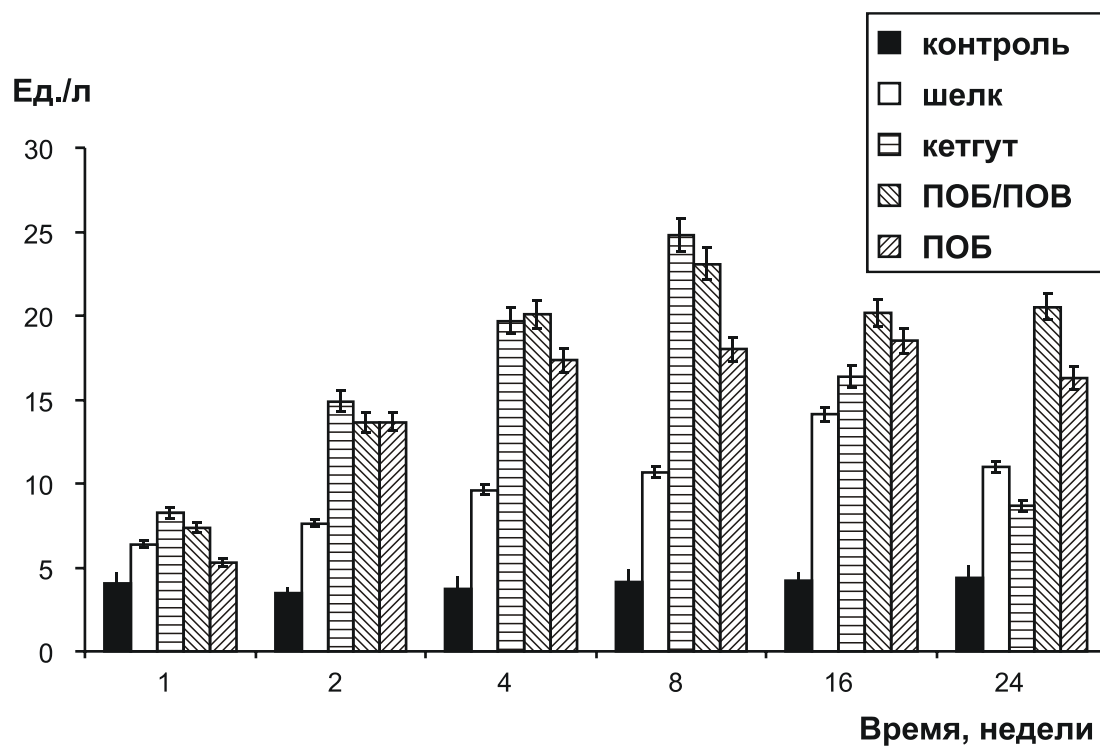


Рис. 6.12. Динамика активности кислой (КФ) фосфатазы сыворотки крови крыс в хроническом эксперименте (Шишацкая с соавт., 2002е).

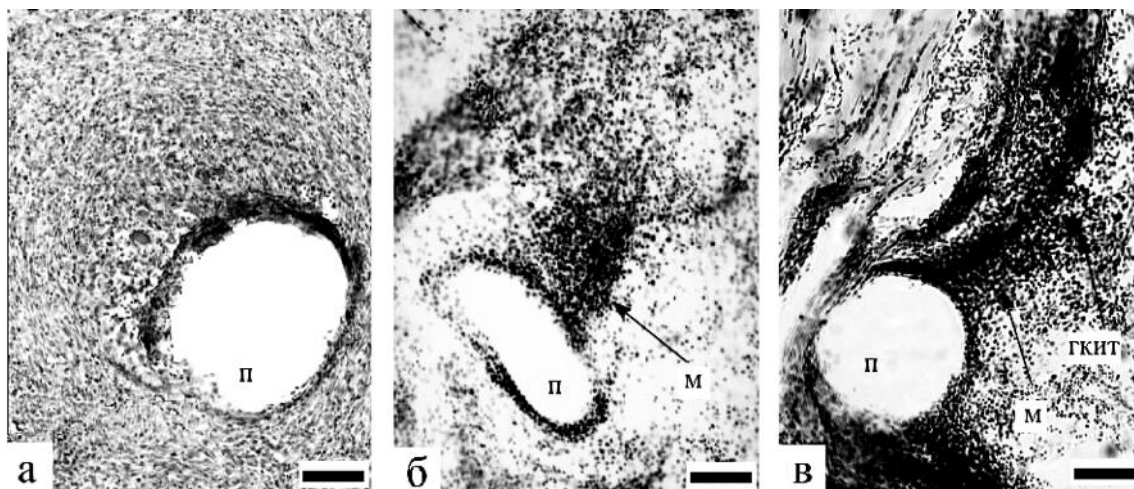


Рис. 6.13. Гистохимическая реакция тканей на кислую фосфатазу (КФ) по Гомори: 1(а), 2(б) и 4(в) недели после имплантации ПОБ-нити. Маркер – 0,01 мм. Обозначения: п – полимерная нить, м – макрофаги, ГКИТ – гигантские клетки инородных тел (Шишацкая с соавт., 2002 е).

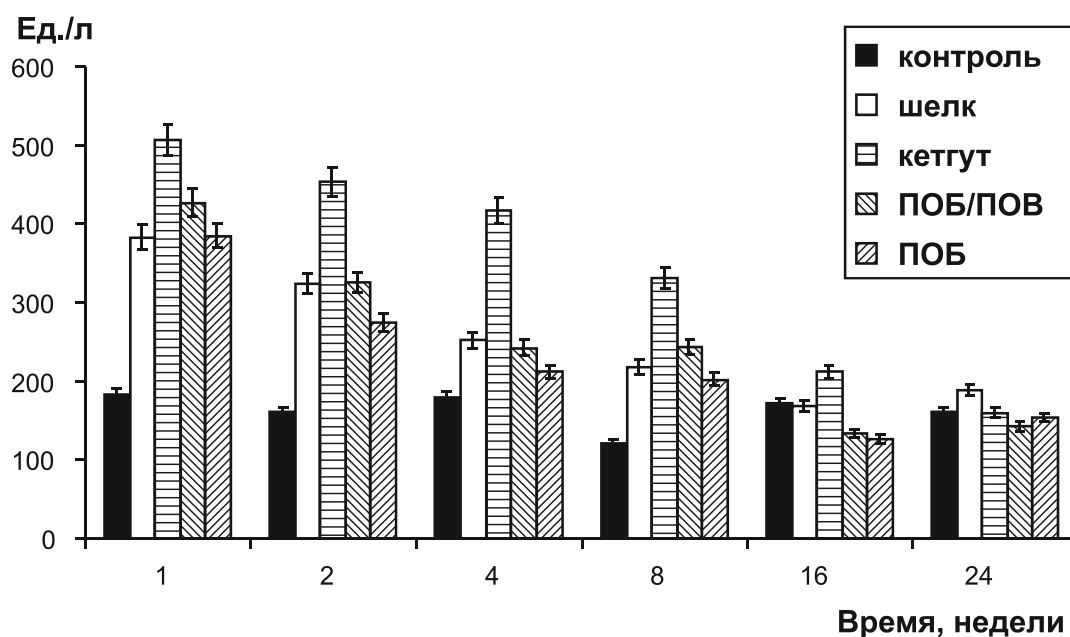


Рис. 6.14. Динамика активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови крыс в хроническом эксперименте (Шишацкая с соавт., 2002 е).

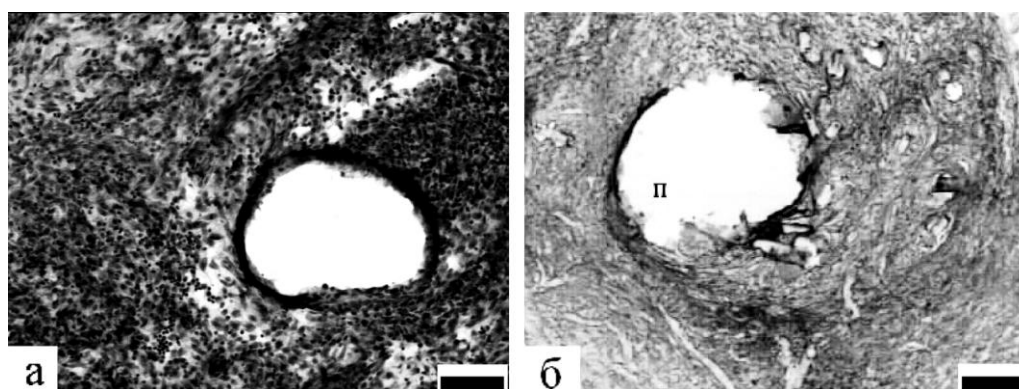


Рис. 6.15. Гистохимическая реакция тканей на щелочную фосфатазу (ЩФ) по Гомори: 1(а) и 4(б) недели после имплантации ПОБ-нити. Маркер – 0,01 мм. Обозначения: п – полимерная нить (Шишацкая с соавт., 2002 е).

Микроскопическая картина в месте имплантации ПОБ и ПОБ-со-ПОВ на 7 сутки после операции характеризовалась незначительным отеком тканей вокруг имплантированных нитей и единичными тонкими зонами некроза (рис. 6.11). Шовные нити были окружены преимущественно макрофагами и лимфоцитами, а также нейтрофилами и фибробластами. Отмечено начало формирования вокруг имплантатов фиброзных капсул. Реакция тканей вокруг экспериментальных нитей из ПОА по силе воспаления была сопоставима с реакцией тканей на шелк и значительно менее выражена по сравнению с реакцией на кетгут.

Через 2 недели после операции признаки воспаления уменьшились, незначительная отечность тканей вокруг всех имплантатов сохранялась (рис. 6.16); в зоне воспаления по-прежнему встречались лейкоцитарные клетки. В сформировавшихся вокруг ПОБ и ПОБ-со-ПОВ капсулах отмечено увеличение количества зрелых макрофагов секреторно-фагоцитарного типа, в среднем, соответственно, до  $6.36 \pm 0.42$  и  $5.50 \pm 0.40$  в п/зр. Для них характерно смещение складчатого ядра к одному из полюсов клетки, развитый комплекс Гольджи, довольно много митохондрий овальной или вытянутой формы. Значительная часть цитоплазмы макрофагов занята лизосомами и фагосомами; внешняя клеточная мембрана образует толстые короткие и пальцевидные выпячивания. Макрофаги сгруппированы, как правило, на внутренней стороне капсул, примыкающих к нитям. Среди окружающих тканей отмечены единичные гигантские клетки инородных тел с 4–6 ядрами (рис. 6.17). Гистохимически зарегистрировано увеличение в цитоплазме макрофагов количества гранул кислой фосфатазы. Это коррелировало с ее активностью в сыворотке крови, увеличившейся на этом сроке до 13 ед./л (рис. 6.12). В капсуле вокруг кетгута, в отличие от шелка, также отмечено увеличение количества макрофагов (табл. 6.10).

Через 4 недели после операции толщина фиброзных капсул вокруг имплантатов из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ увеличилась до  $172.23 \pm 13.64$  и  $169.67 \pm 5.97$  мкм. Это было сопоставимо с ТК вокруг шелка и в 2 раза меньше, чем ТК вокруг кетгута. Продолжало увеличиваться количество активных, с большим количеством выростов и клеточных лизосомальных структур макрофагов (до 11–12 в п/зр) и ГКИТ, а также активность КФ в них (рис. 6.13в).

Капсулы вокруг ПОА-имплантатов, в основном, были представлены фибробластами и коллагеновыми волокнами, которые начинали формироваться в пучки (рис. 6.11 и 6.16).

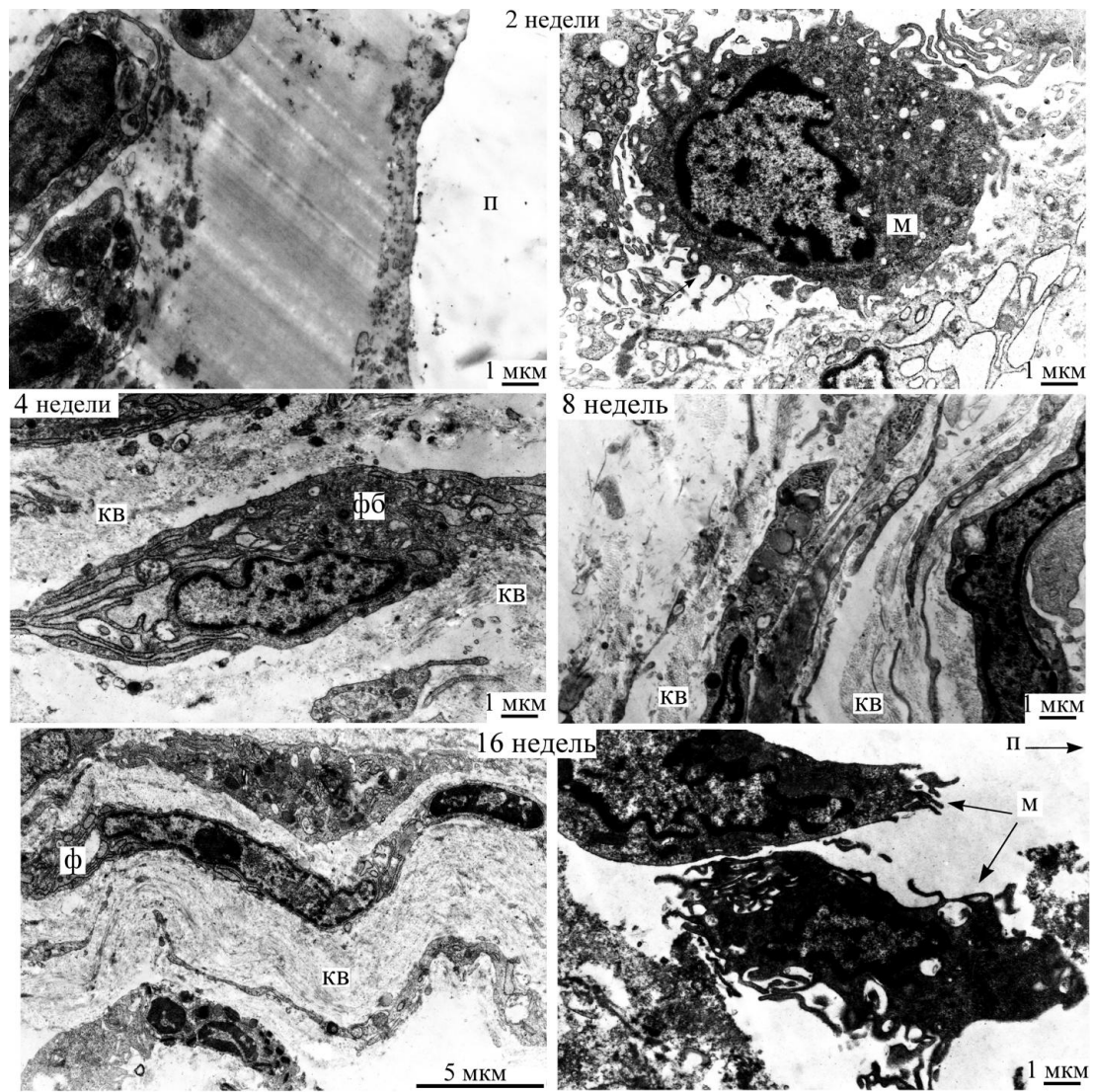


Рис. 6.16. Ультратонкие срезы участков фиброзных капсул, формирующихся вокруг имплантированных нитей из ПОА на разных сроках.  
 Обозначения: п – полимерная нить, м – макрофаги, я – ядро, аг – аппарат Гольджи, фб – фибробласты, ф – фиброциты, кв – коллагеновые волокна (Volova et al., 2003a).



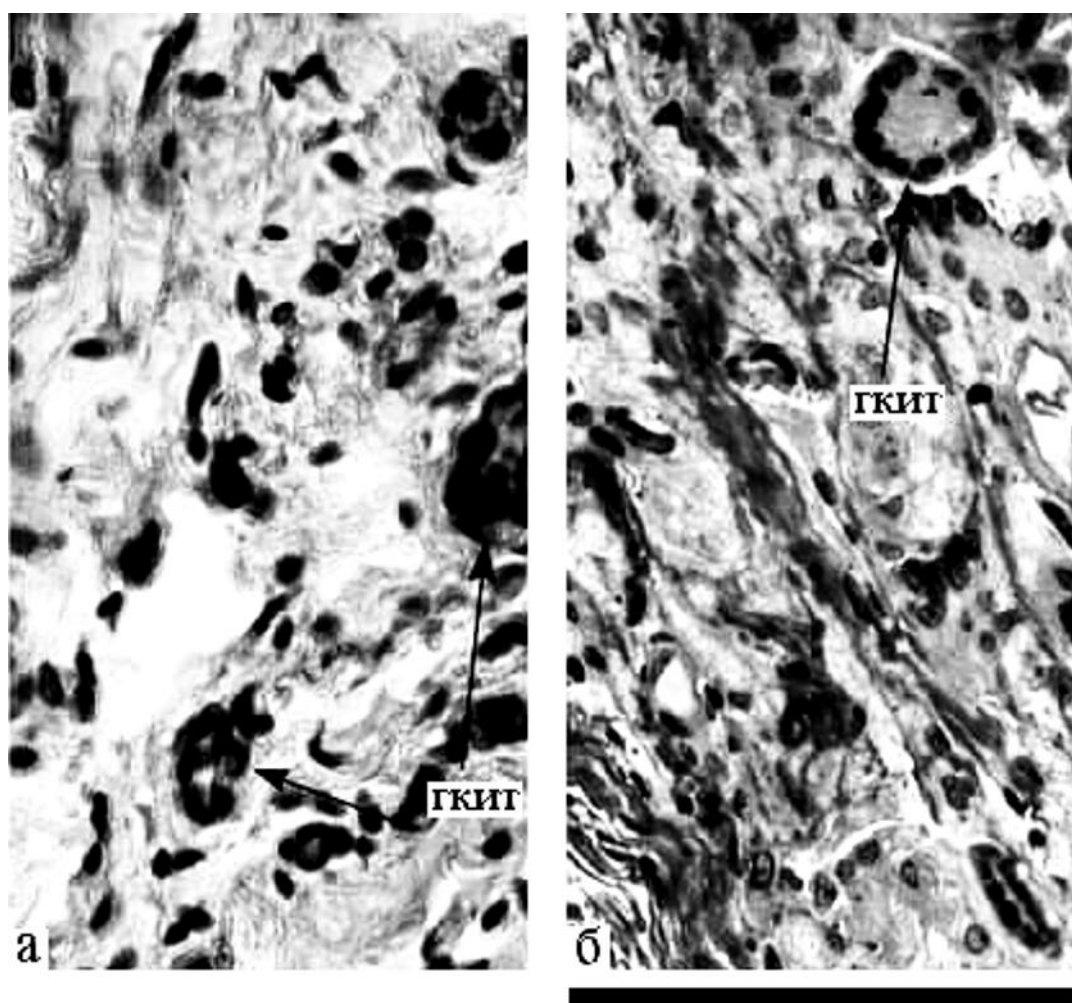


Рис.6.17. Гигантские многоядерные клетки инородных тел с упорядоченным кольцевидным расположением ядер (ГКИТ) в тканях, окружающих ПОб-нити: 2 (а) и 16 (б) недель после имплантации. Полутонкий срез. Толуидиновый синий. Маркер 0,01 мм. (Шишачкая, 2003)

Через 8 недель гистологическая картина в зоне имплантации ПОб и ПОб-со-ПОВ практически не изменилась, равно как и толщина капсул и их клеточный состав. Капсулы пронизаны сосудами микроциркуляторного русла (рис. 6.18); в них преобладали коллагеновые волокна зрелого типа (рис. 6.16). В зоне, примыкающей к ПОб и ПО-со-ПОВ, по-прежнему регистрировалось большое количество активных макрофагов. Их количество было сопоставимо с показателями активности КФ в сыворотке крови животных (рис. 6.12). Увеличение активности КФ свидетельствует об усилении фагоцитарной реакции макрофагов, являющихся, как установлено недавно, одним из активных агентов биодеструкции ПОА (Williams and Martin, 2002). В структуре ФК, окружающих имплантаты из ПОб и ПОб-со-ПОВ, идентифицированы активные фибробластические элементы и формирующиеся коллагеновые волокна.

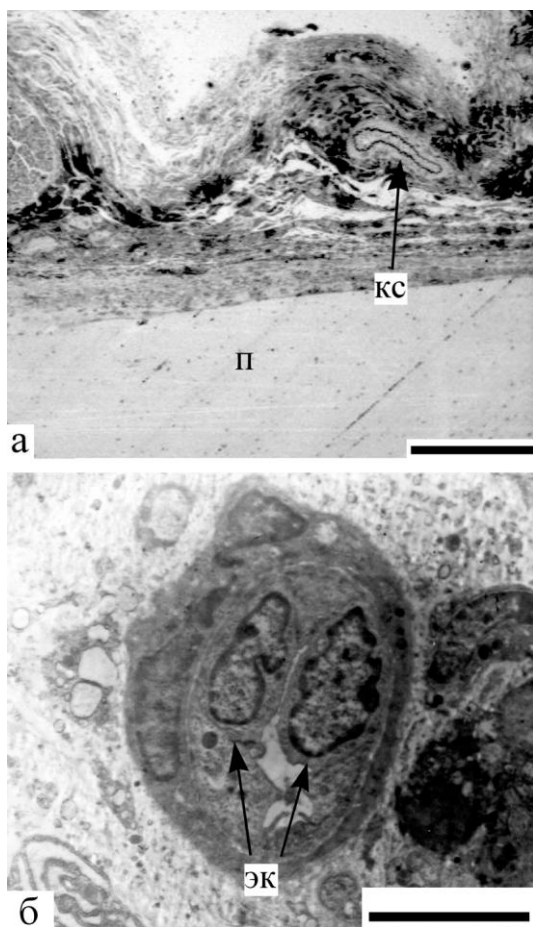


Рис. 6.18: а – полутонкий срез. Кровеносный сосуд (КС) во вновь образованной ткани вокруг ПОБ-нити (п) (4 недели после операции). Маркер 0,01 мм.  
 б – формирующийся сосуд микроциркуляционного типа в фиброзной капсуле (8 недель после операции).  
 Обозначения: ЭК – эндотелиальные клетки. Маркер 5 мкм.  
 (Шишацкая, 2003).

Средняя толщина капсул (ТК) вокруг ПОБ и ПОБ-со-ПОВ составила на этом сроке, соответственно,  $161.20 \pm 5.93$  и  $158.08 \pm 4.37$  мкм; рядность фибробластов (РФ) –  $9.50 \pm 0.57$  и  $10.57 \pm 0.67$ . Это было сопоставимо с ТК вокруг шелка на этом сроке (рис. 6.19б) ( $173.17 \pm 5.46$  мкм), однако увеличения количества макрофагальных клеток вокруг шелка не отмечено. В тканях, окружающих кетгут, по-прежнему отмечены лейкоцитарные клетки; толщина фиброзной капсулы составила  $514.21 \pm 12.01$  мкм (рис. 6.19А).

Спустя 16 недель после операции вокруг шовных нитей зафиксировано значительное истончение капсул (рис. 6.11), до  $54.09 \pm 3.28$  и  $43.71 \pm 3.11$  мкм вокруг ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, соответственно, при снижении РФ в них до  $4.64 \pm 0.37$  и  $3.36 \pm 0.37$ . Однако количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к ПОА-имплантатам, по-прежнему высоко (табл. 6.10). Отмечены макрофаги непосредственно на полимерных нитях (рис. 6.16), появились ГКИТ с 10–12 ядрами (рис. 6.17). Среди фибробластических элементов преобладали зрелые клетки. В периферических частях капсул наблюдалось образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним цепочек фиброцитов. Здесь же определялись активные фагоцитирующие макрофаги и ГКИТ. Это позволяет предположить миграцию продуктов деструкции материала.

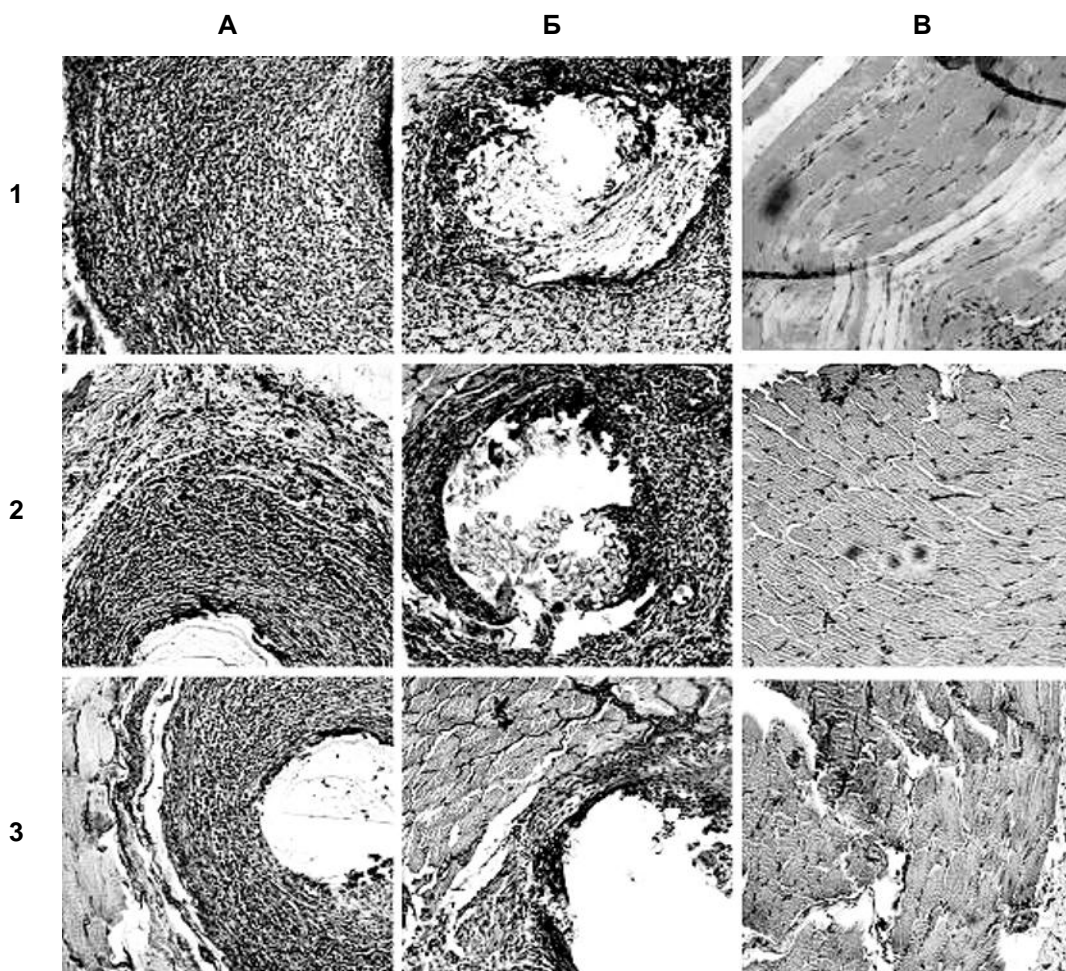


Рис. 6.19. Морфология тканей вокруг имплантатов из кетгута (А), шелка (Б) через 8, 16 и 24 недели после операции, соответственно, 1, 2 и 3 (обозначено слева).

Мышечная ткань у интактных животных на этих же сроках.

Гематоксилин–эозин. Маркер – 0,01 мм  
(из неопубликованных данных Шишацкой).

Через 24 недели после операции была отмечена дальнейшая инволюция фиброзных капсул вокруг имплантированных нитей из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ (рис. 6.11); ТК уменьшились до  $48.02 \pm 5.25$  и  $33.73 \pm 2.05$  мкм, соответственно. В капсулах преобладали зрелые коллагеновые волокна, в них по-прежнему присутствовали активные фагоцитирующие макрофаги. Вокруг шелка значительного истончения фиброзных капсул не наблюдали; к концу эксперимента ТК составили 125–132 мкм. В месте имплантации кетгута, несмотря на активную деструкцию (к 4 мес. он не определялся в тканях), плотные капсулы сохранялись. Через 16 и 24 недели после имплантации ТК составили, соответственно,  $342,00 \pm 9,68$  и  $272,14 \pm 4,11$  мкм (рис. 6.19). Пучки коллагеновых волокон в ФК вокруг кетгута были гораздо толще и занимали практически весь объем капсулы (рис. 6.20).

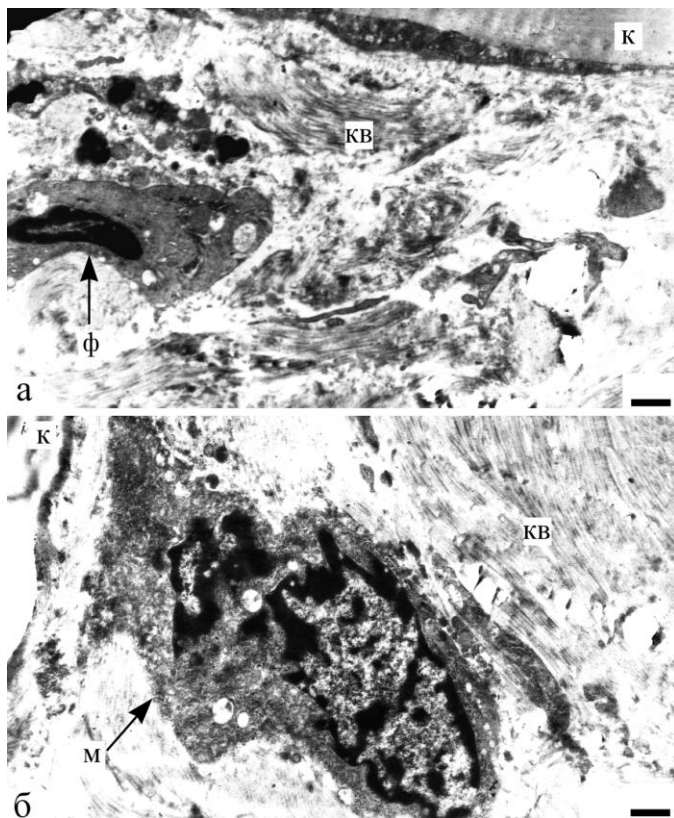


Рис. 6.20. Ультратонкий срез тканей вокруг кетгута: а и б – пучки коллагеновых волокон (КВ) (8 и 16 недель после операции).  
 Обозначения:  
 м – макрофаги,  
 ф – фиброциты.  
 Маркер – 1 мкм  
 (Шишацкая, 2003)

Дальнейшее наблюдение за состоянием тканей у животных, которым были имплантированы нити из ПОб и ПОб-со-ПОВ, не выявило неблагоприятных явлений в прилегающих тканях. Спустя 36 недель ТК вокруг нитей из полиоксиалканоатов составляла 20–40 мкм. Имплантаты были окружены здоровыми тканями из вновь сформированных волокон, ориентированных вокруг нитей.

Через 48 недель толщина фиброзных капсул не превышала 5–10 мкм (рис. 6.21). В непосредственной близости с нитями – по-прежнему значительное количество моно- и полиядерных макрофагальных клеток.

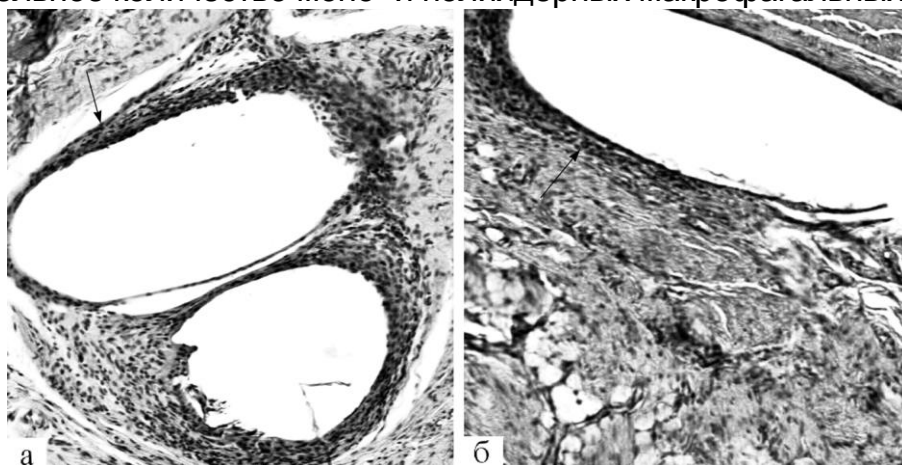


Рис. 6.21. Морфология тканей вокруг ПОб-со-ПОВ спустя 36 (а) и 48 (б) недель после имплантации. Гематоксилин – эозин. Маркер – 0,01 мм (Volova et al., 2003a).

Таким образом, установлено, что воспалительная и регенераторная реакции тканей животных на имплантаты из ПОА, на всем протяжении эксперимента, независимо от химического состава материала, была одинаковой. Присутствие оксидвалерата в полимере не изменяло длительности и интенсивности воспаления, а также характера развития фиброзной капсулы вокруг нитей. В течение двенадцати месяцев наблюдения в месте имплантации ПОА обоих типов неблагоприятных проявлений в виде гнойного воспаления, некроза, кальцификации и малигнизации фиброзных капсул не отмечено.

В целом, выполненные комплексные исследования полиоксиалканаотов и изделий из них в условиях *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о высоких медико-биологических свойствах данного материала. Это позволяет рекомендовать данный класс биodeградируемых полимеров для создания био- и гемосовместимых изделий медицинского назначения, в том числе, и в качестве матриц в биоискусственных органах.

## Глава 7. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ

Полиоксиалканоаты, как уже было отмечено, по ряду физико-химических свойств сходны с синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Помимо термопластичности, полиоксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, биоразрушаемостью и биосовместимостью. Полиоксиалканоаты чрезвычайно различаются между собой по структуре и свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более того, недавно продемонстрированные возможности получения на основе ПОА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющие направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность, температурные и другие характеристики, еще более усиливают привлекательность ПОА и расширяют возможные сферы применения.

Линейная структура молекул ПОА придает им свойство термопластичности и изменения прочности (возрастание по направлению растяжения). При нагревании молекулярные цепи в ПОА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов (прессования, экструзии и др.) получать из ПОА разнообразные изделия и материалы. Гомогенный полиоксибутират по механическим свойствам сходен с полипропиленом и полистерином, однако обладает лучшими газобарьерными свойствами (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью, при этом проницаемость для водяного пара через него втрое ниже по сравнению с полипропиленом.

Из ПОА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, различных полых форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.), а также гелей и клеев. Совокупность характерных свойств делает их перспективными для применения в различных сферах, – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах (Abe, Doi, 1992; Brandle et al., 1990; Luzier, 1992; Muller, Seebach, 1993 et al.) (рис. 7.1).



Рис. 7.1. Продукция из Биопола (Asrar and Grauys, 2002).

Масштабы применения полиоксиалканоатов в настоящее время сдерживаются достаточно высокой стоимостью (практически на порядок более высокой, по сравнению с полиолефинами). Однако возрастающие требования к охране окружающей среды, с одной стороны, и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет повышения эффективности производства, с другой, делают полиоксиалканоаты одним из перспективных материалов XXI века.

Уже сейчас сферы применения полиоксиалканоатов – самые различные. Данные материалы активно исследуются с целью переработки в США, Скандинавии и Европе, особенно в Германии и Голландии. Совет объединенной Европы утвердил концепцию необходимости замены не разрушаемых синтетических пластиков биodeградируемыми полимерами, а с 1993 г санкционировано применение упаковочной продукции из ПОА в пищевой промышленности.

## **7.1. Использование полиоксиалканоатов в медицине**

Развитие науки приводит к все более широкому внедрению в медицине высокомолекулярных соединений, в том числе синтезируемых живыми системами, то есть биополимеров (Amass et al., 1998; Angelova, Hunkeler, 1999). Разнообразие полимеров, варьирование в широких пределах их стереоконфигурации и молекулярной массы, возможность получения композитов в разнообразных сочетаниях с различными веществами, – все это является основой для получения широчайшего спектра новых материалов с новыми ценными свойствами (Gregor, 1975; Kronenthal et al., 1975; «Полимеры медицинского назначения», 1981; Платэ, Васильев, 1985; Williams, 1987; Alper, 1991; Адамян, 1994; Amass et al., 1998; «Биосовместимость», 1999; Nasser et al., 2001).

Среди применяемых и активно разрабатываемых в настоящее время биоматериалов – алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), силикон, полиэтилентерефталат (ПЭТФ) и с недавних пор – полимеры оксипроизводных жирных кислот (полиоксиалканоаты, ПОА) (Amass et al., 1998; More and Sauders, 1998; Биосовместимость, 1999; Sudesh et al., 2000).

Сферы применения полиоксиалканоатов в медицине потенциально широки и могут включать сердечно-сосудистую хирургию, ортопедию, урологию, стоматологию и др. (Amass et al., 1998; Madison, Huisman, 1999; Williams et al., 1999; Sudech, Doi, 2000; Stock et al., 2001; Asrar and Gruys, 2002). Особенно перспективным считается применение ПОА в клеточной и тканевой трансплантологии для реконструктивной хирургии тканей и создания биоискусственных органов (Williams and Martin, 2002):

Сформировавшееся в последние годы мультидисциплинарное направление биоматериаловедения и трансплантологии – тканевая инженерия, остро нуждается в специализированных биосовместимых материалах. Тканевая инженерия ориентирована на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей (Mooney and Vacanti, 1993; Williams et al., 1999; Heath, 2000; Humacher, 2000; Sodian et al., 2000; Nasserri et al., 2001). 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.

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 (рис. 7.2).

Применение таких биоконструкций, дополнительно нагруженных лекарственными препаратами (антибиотиками, гормонами, витаминами, белковыми факторами и др.), является революционным направлением в реконструктивной и прецизионной хирургии и в трансплантологии и имеет огромные перспективы.



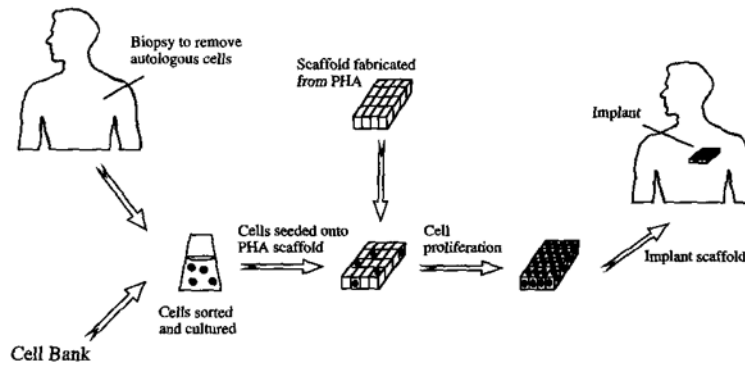


Рис. 7.2. Применение ПОА в тканевой инженерии (Williams et al., 1999).

Ключевой проблемой для успеха создания таких биоконструкций является наличие адекватного биodeградирующего и биосовместимого материала. В настоящее время ПОА рассматриваются в качестве особо перспективного материала для изготовления матриц при конструировании тканевых протезов и биоискусственных органов. Наиболее многообещающим представляется использование этих полимеров для регенерации поврежденных кожных покровов, изготовления имплантатов кровеносных сосудов и клапанов сердца, закрытия дефектов мягких и костных тканей.

### 7.1.1. Сердечно-сосудистая хирургия

В настоящее время основное биомедицинское применение ПОА ориентировано на конструкции для сердечно-сосудистой хирургии. Одним из наиболее разработанных направлений является использование полиоксибутирата (ПОБ) в качестве нетканых лоскутов для закрытия дефекта перикарда в постоперационном периоде для предотвращения спаечного процесса (Bowald and Johansson, 1990; Malm et al., 1992a, b).

Группа сотрудников Медицинского университета и отделения торакальной и сердечно-сосудистой хирургии госпиталя г. Ланда в Швеции под руководством профессора Малма исследовала возможность снижения осложнений, имеющих место после операций на открытом сердце, за счет имплантации полимерных лоскутов из ПОБ в качестве временного перикарда (Malm et al., 1992a, b). Животных (были взяты овцы) наблюдали в течение 2.5 лет относительно контроля (у животных после иссечения участка перикарда перикардальная полость была оставлена открытой). В ходе опыта у экспериментальных животных развития спаечного процесса между сердцем и грудиной не отмечено (рис. 7.3). Показано, что в ответе тканей на имплантацию ПОБ принимали участие многоядерные макрофаги. По мере формирования новой ткани на фоне деструкции полимерного лоскута в многоядерных макрофагах было отмечено наличие включений частичек ПОБ. С применением СЭМ выявлено, что на перикардальной поверхности регенерированной ткани со стороны сердца сформировался мезотелеподобный слой, который полностью покрывал подлежащий слой коллагена.

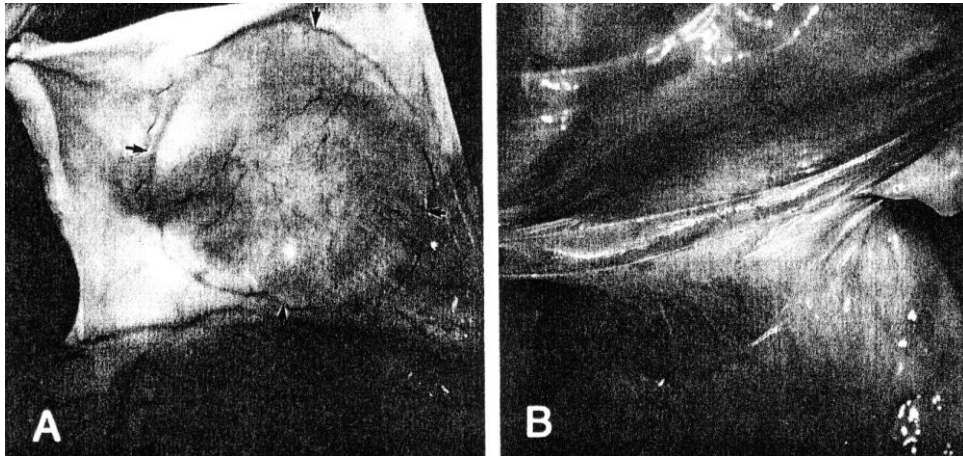


Рис. 7.3. Макроскопические снимки фрагментов тканей в месте имплантации:  
 А – 12 месяцев после имплантации модельного перикарда из ПОВ, место регенерированных тканей отмечено стрелками; спаечный процесс отсутствует;  
 В – развитие спаечного процесса через 12 месяцев после операции, перикард был оставлен открытым (Malm et al., 1992a).

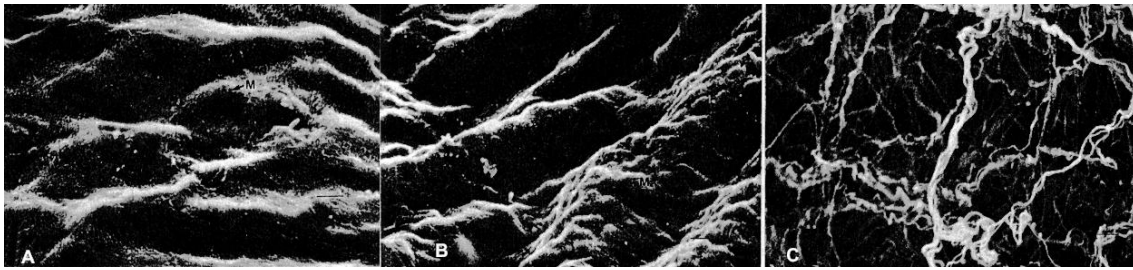


Рис. 7.4. Электронные микрофотографии ткани перикарда после операции:  
 (А) – поверхностный слой регенерированной ткани из мезотелеобразующих клеток спустя 24 месяца после операции в месте имплантации лоскута из ПОВ;  
 (В) – вид нормальной ткани нативного перикарда, (аналогичен А);  
 (С) – поверхность ткани перикарда в контрольной группе (слой мезотелия отсутствует) (Malm et al., 1992a).

Морфология поверхности вновь сформированных тканей была сходной с нативным перикардом (рис.7.4).

В следующей работе авторов (Malm et al., 1994) биodeградируемые нетканые пленочные лоскуты из ПОВ были имплантированы в правый вентрикулярный тракт и легочную артерию овцам. В контрольной группе животным имплантированы лоскуты из дакрона. Животных наблюдали в течение 3–12 месяцев после операции. Регенерированный сосуд на основе ПОВ имел сходные структурные и биохимические показатели с нативными тканями.

Исследованы имплантаты – протезы легочной артерии и створок клапана легочной артерии, изготовленные из ПОА. Экспериментальным животным имплантировали полимерные трубочки, засеянные аутоклетками из сонной артерии, контрольным – полимерные трубочки без клеток. У контрольных животных произошла окклюзия имплантатов на разных постоперационных сроках. В опытных группах все имплантаты оставались функционирующими до конца наблюдения (рис. 7.5).

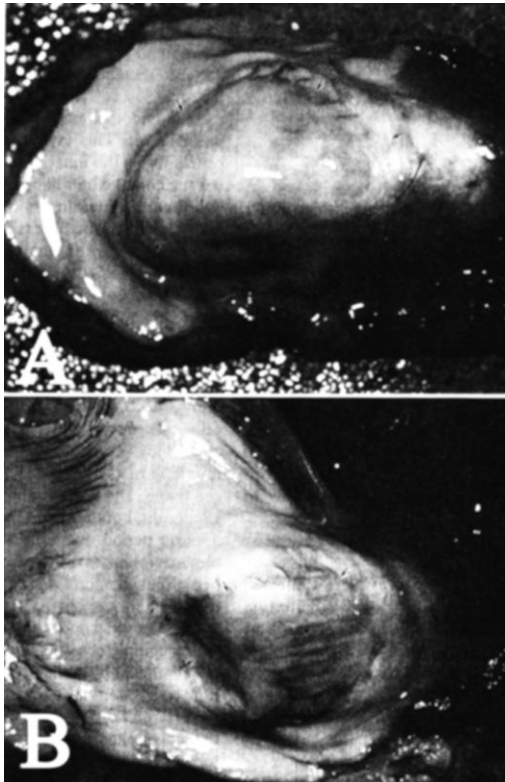


Рис. 7.5. Макроскопические фотографии тканей в месте имплантации:  
 А – спустя 12 месяцев после имплантации лоскута из ПОБ, отчетливо видна регенерированная ткань внутри тракта оттока, видны нормальные вновь сформированные ткани в месте имплантации;  
 Б – спустя 12 месяцев после имплантации лоскута из дакрона, виден тонкий слой неонтимы (Malm et al., 1994).

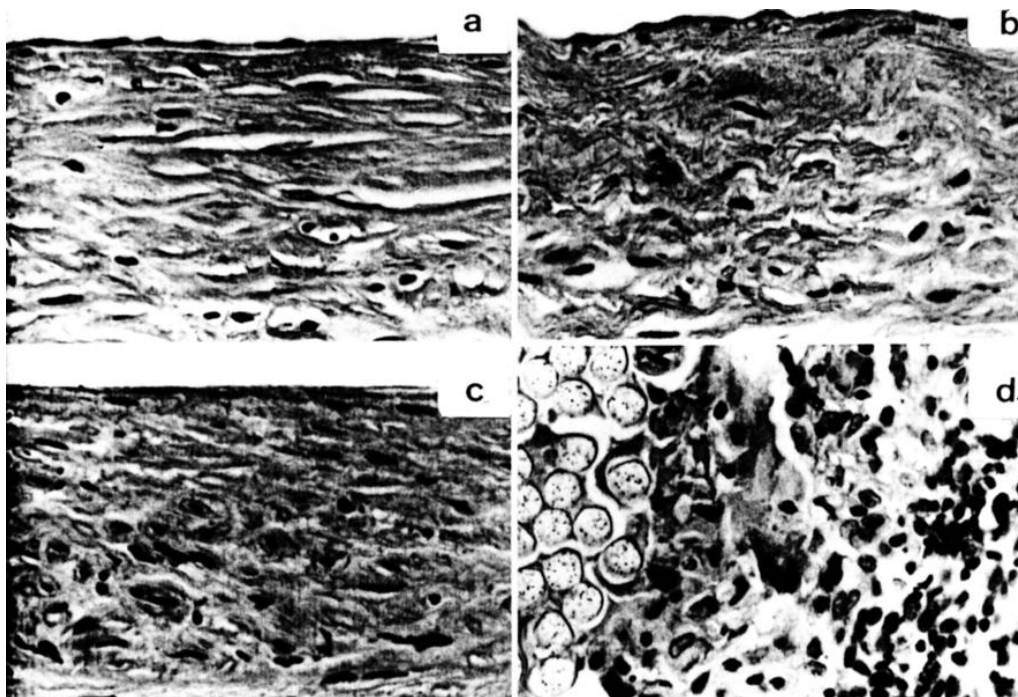


Рис. 7.6. Снимки срезов тканей в месте имплантации: а – регенерированная ткань спустя 9 месяцев после имплантации лоскута из ПОБ, видна единичные клетки;  
 б – срез нативной ткани легочной артерии, структура аналогична тканям на срезе (а);  
 с – неонтима, сформированная спустя 12 месяцев в месте имплантации дакрона;  
 д – регенерированные ткани в месте имплантации дакрона спустя 9 месяце, видна выраженная клеточная инфильтрация в тканях, прилегающих в имплантату из дакрона.  
 Окраска по Ван-Гизону. Увеличение  $\times 400$  (Malm et al., 1994).

Гистологическими исследованиями зафиксировано образование в среднем слое эластиновых волокон и специфического эндотелиального фактора Виллибранта на поверхности пластин.

В работе (Nkere et al., 1998) проведены более сложные наблюдения в экспериментах на телятах, которые были подвергнуты шунтирующей операции на сердце. При этом ПОБ был использован в качестве перикардального лоскута. Однако, в данной работе существенных отличий в постоперационном ответе тканей у экспериментальных животных в сравнении с контрольными (полимерный имплантат отсутствовал, перикардальная полость была оставлена открытой) отмечено не было.

Сотрудниками отделения грудной и сердечно-сосудистой хирургии университетского госпиталя г. Упсалы (Швеция) исследованы экспериментальные образцы перикардов, изготовленные из ПОБ (Duvernoy et al., 1995). Группе пациентов из 19 человек, подвергшимся операциям на открытом сердце, были имплантированы модельные перикарды, изготовленные из ПОБ. С помощью компьютерной томографии эти пациенты на сроке 6 и 24 месяца после операции были обследованы на наличие спаечного процесса в области операции (рис. 7.7).

У больных с ПОБ-имплантатом было отмечено достоверно низкое возникновение осложнений в виде спаечного процесса между лоскутом ПОБ и поверхностью сердца по сравнению с контрольной группой, представленной пациентами, которым лоскуты из ПОБ не имплантировали. В ходе наблюдений площадь модельных перикардов постепенно замещалась вновь образованными тканями по мере деструкции полимера. При этом в ходе наблюдения отмечено наличие жировой клетчатки между имплантатом и поверхностью сердца. У больных, которым после аналогичной операции полимерный перикард не имплантировали, были отмечены множественные спаечные осложнения (Duvernoy et al., 1995).

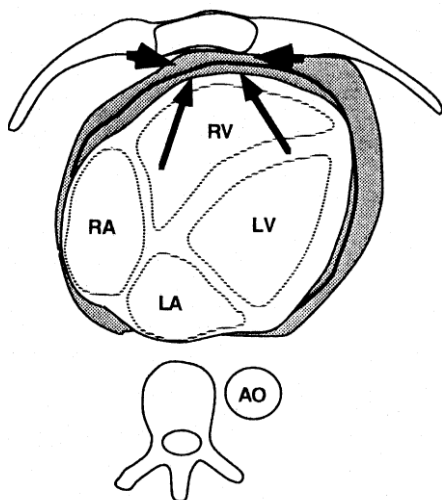


Рис. 7.7. Схематический показ проведения компьютерного сканирования сердца. Показано отсутствие/или наличие жировой ткани в загрузинной области (короткие стрелки) и жировая ткань в эпикардии (длинные стрелки). Правый желудочек (RV), левый желудочек (LV), левое предсердие (LA), нисходящая аорта (АО) (Duvernoy et al., 1995).

Нетканые лоскуты, изготовленные из полиоксibuтирата, исследованы для ликвидации дефектов межпредсердной перегородки в эксперименте на телятах (Malm et al., 1992c). Зафиксировано образование сформированных эндотелиальных слоев со стороны правого и левого предсердий с субэндотелиальным слоем коллагена и гладкомышечными клетками. Как и в других работах, полимерные лоскуты постепенно деградировали с участием полинуклеарных фагоцитирующих макрофагов, в которых спустя 12 месяцев присутствовали фрагменты ПОБ. По мере биодеградации лоскута из ПОБ формировалась ткань, сходная с таковой у нативной межпредсердной перегородки, достаточно прочная для предотвращения развития шунта между предсердиями.

Как известно, применение металлических стентов в кардиохирургии сопряжено с возникновением осложнений в виде рестенозов вследствие разрастания сосудистой стенки. В этой связи ПОА исследуются в качестве потенциального материала для изготовления биоабсорбируемых стентов, в том числе в комбинации с системами доставки лекарственных средств (Peng et al., 1996). В работе (Van der Giessen et al., 1996) испытан сополимер оксibuтирата и оксивалерата в виде полосок, нанесенных на поверхность витых металлических стентов, которые были имплантированы в коронарные артерии (диаметром 2.5–3.0 мм) свиней. В ходе опыта данные имплантаты сравнивали с другими абсорбируемыми полимерами, типа полилактидов и полигликолидов. Через 4 недели в месте имплантации сополимера ПОБ-со-ПОВ, аналогично другим биоматериалам, отмечена выраженная воспалительная реакция и фиброцеллюлярная пролиферация тканей. Следует отметить, что имплантаты не были простерилизованы перед операцией. Эти результаты отличаются от реакции клеток на данные материалы *in vitro*, вероятно, вследствие того, что *in vivo* на характер ответа тканей влияют многие дополнительные факторы, такие как форма имплантата, место имплантации, характер продуктов деструкции материала и др.

Изготовленные из полиоксibuтирата сосудистые стенты (Schmitz and Behrend, 1997) тестированы в эксперименте на кроликах (Underdorden et al., 1998). В последствие были изготовлены более эластичные стенты с использованием в качестве пластифицирующего агента триэтил цитрата; поверхность стентов была также обработана лазерной резкой (Behrend, 2000b). Стенты были имплантированы в артерии кроликам и вызывали незамедлительную реакцию сосудистой интимы. Отмечено, что материал стентов деградировал достаточно быстро. Однако в одной из последних работ в ходе сравнительного исследования ПОБ-стентов в сравнение с танталовыми конструкциями получены отрицательные результаты (Unverdorben et al., 2002). Так, при имплантации стентов, изготовленных из ПОБ, в

подвздошную артерию кроликам наблюдали выраженную воспалительную реакцию, повышенную продукцию коллагена, а также сужение и повреждение стенок сосудов.

Полиоксиалканоаты исследуются также в качестве материала для изготовления сосудистых протезов. Последние имплантируются для восстановления или пересадки поврежденных и подверженных риску сосудов. Протезы сосудов крупного диаметра предварительно пропитываются белками. Однако в ходе эксплуатации таких протезов возможно проявление и развитие нежелательных иммунологических реакций.

Следует отметить, что еще до планомерных медико-биологических исследований полиоксиалканоатов, которые были развернуты в конце 80-х – начале 90-х годов, в одной из первых работ (Baptist and Ziegler, 1965) была показана возможность использования 3-полиоксибутирата для восстановления кровеносных сосудов.

В настоящее время с целью улучшения функциональных свойств применяемых сосудистых протезов, получаемых из синтетических материалов, предпринята попытка использования для их покрытия сополимера 3-ПОБ-со-4-ПОБ (Noisshiki and Komatsuzaki, 1995). Такие сосудистые протезы были имплантированы собакам и исследованы на сроке 2 и 10 недель. Отмечено, что деградация полимера началась уже на второй неделе. В работах (Marois et al, 1999c; 2000) оценен в качестве пропитывающего покрытия синтетических протезов эластичный сополимер оксигексаноата и оксиоктаноата (3-ПОГ-со-3-ПОО). В эксперименте на крысах проведено сравнение эффективности сосудов, пропитанных данным полиоксиалканоатом и белком, а также флюорополимером на сроке от 2 до 180 суток. Внутри сосудов, покрытых ПОА, не отмечено инфильтрации ткани. При этом обнаружено, что деградация полимера происходила очень медленно. Так, молекулярная масса полимера снизилась за 6 месяцев эксперимента всего на 30 %. Ответ тканей на имплантацию таких протезов был очень мягким. Имплантаты, изготовленные из данного сополимера, исследованы в качестве протеза легочной артерии и створок клапана легочной артерии в экспериментах на ягнятах (Shum-Tim et al., 1999). Экспериментальным животным в качестве протеза имплантировали полимерные трубочки (диаметр 7 мм), изготовленные из сетчатого полилактида, на поверхность которых был нанесен слой 3-ПООГ-со-3-ПОО. Имплантаты предварительно были засеяны аутоклетками из сонной артерии, и после подращивания клеток были имплантированы животным. Контрольной группе имплантировали полимерные трубочки без клеток. У контрольных животных в течение первых недель отмечено развитие аневризм и окклюзия имплантатов. В экспериментальной группе полимерные имплантаты, засеянные клетками, оставались функциональными в

течение всего периода наблюдения. Зафиксировано образование в среднем слое формирующейся ткани эластиновых волокон и специфического эндотелиального фактора Виллибранта. Осложнений в виде развития аневризм или стриктур не отмечено. Механическая прочность испытуемых протезов сосуда была сопоставима с нативными сосудами (Shum-Tim et al., 1999). Результаты данного опыта резко отличаются от аналогичных исследований модельных сосудистых протезов, изготовленных из композита синтетических полилактид-полигликолида. При использовании последних отмечена быстрая деструкция данного пористого композита и развитие аневризм в течение нескольких недель после операции.

Следует отметить, что самые удачные результаты применения ПОА в сердечно-сосудистой хирургии получены в ходе их исследования в качестве клапанов сердца, сконструированных по технологии клеточной и тканевой инженерии. Имеющиеся на сегодняшний день результаты тестирования ПОА позволяют надеяться, что применение полиоксиданов в этой области позволит в ближайшее время снять проблему, существующую при использовании механических и животных клапанов. При применении последних необходимо применение антикоагулянтной терапии, возникает необходимость также в повторных операциях для замены отработанных клапанов и их замены, например, у растущих детей. Как установлено, тканно-инженерные конструкции полимерных клапанов в результате развития из засеянных клеток новых тканей и удлинения имплантата по мере роста детей и увеличения массы сердца соответствуют данному процессу во времени, что исключает необходимость повторных имплантаций. Следует отметить также, что абсорбируемые жесткие синтетические материалы, такие, как полигликолактиды, пригодны только для изготовления двустворчатых клапанов и не пригодны для изготовления трехстворчатых клапанов, например, клапанов легочных артерий.

В работе (Stock et al., 2000) получены положительные результаты при сравнительном испытании на животных моделей легочных шунтов, изготовленных из полиоксиданата (ПОО), в сравнении с полилактидными имплантатами. Трехстворчатые полимерные трубочки, засеянные аутологическими срединными клетками эндотелия *in vitro*, после семидневного подращивания клеток были имплантированы овцам. В ходе постоперационного периода антикоагулянты прооперированному животному не вводили. Функцию клапанов оценивали в динамике в течение 24 недель с использованием эхокардиографии. Параллельно проводили гистологические и биохимические исследования. У опытных животных наблюдали формирование нормально организованной ткани. Образования тромбов в ходе всего эксперимента не отмечено. Молекулярная масса полимерного имплантата при этом

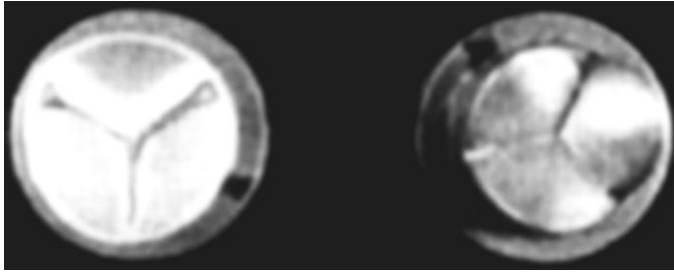


Рис. 7.8. Пористый протез сосудистого клапана, изготовленного с использованием отливки из алюминия (Sodian et al., 2000a).

снизилась за 24 недели примерно на 26 %. У контрольных животных через 4 недели сформировались тромбы на всех створках клапана.

Эластичный, резинооодобный полиоксиоктаноат (ПОО) исследован в качестве матриц сердечных клапанов (Sodian et al., 1999; 2000a). Для изготовления пористой конструкции матрицы частицы хлорида натрия размером от 180 до 240 мкм смешивали с раствором полимера. После высушивания полученные матрицы промывали водой; образованные пористые конструкции использовали для конструирования протеза сердечного клапана (рис. 7.8).

В течение 8 суток клетки не только хорошо пролиферировали, заполняя поры материала, но также синтезировали коллаген и формировали соединительную ткань между наружной и внутренней поверхностями матрицы. Конструкции, изготовленные из пористого сополимера ПОО-со-ПОГ, предварительно засеянные клетками сосудистой ткани, испытаны в биореакторе с пульсирующим током среды (Sodian et al., 1999). Далее была показана пригодность высокоэластичного с низкой температурой плавления полиоксиоктаноата (ПОО) для культивирования клеток эндотелия (Sodian et al., 2000b–d).

Недавно в работе (Hoerstrup et al., 2000) проведена успешная пересадка протезов трехстворчатых сердечных клапанов ягнятам. В качестве матрицы был использован сетчатый полигликолид, покрытый слоем 4-ПОБ. Через 20 недель функциональные характеристики имплантированных клапанов были сходны с нативными. Гистологический анализ подтвердил формирование нормально организованной слоистой ткани с эндотелием. Эхокардиографией продемонстрировано, что створки клапана функционировали в нормальном режиме. Образования стенозов, тромбозов или аневризм не обнаружено. Важно отметить, что с течением времени внутренний диаметр конструкции клапана увеличился с 19 мм в начале эксперимента до 23 мм спустя 20 недель. Отмеченная особенность функционирования ткане-инженерного клапана очень важна, так как может быть использована при операциях у детей.

### 7.1.2. ПОА в челюстно-лицевой хирургии

Полимерные мембраны перспективны для регенерации костных тканей, например, при исправлении дефектов челюсти. Полимерные барьерные мембраны применяют при направленной регенерации ко-



стных тканей для предотвращения заполнения костных дефектов мягкими тканями.

В работе (Galgut et al., 1991) исследован гистологический ответ челюстных тканей крыс на имплантацию сополимерных мембран (3-ПОБ-со-3-ПОВ), которые использовали в качестве барьера. Показана хорошая переносимость данных мембран животными. По сравнению с мембранами из политетрафлюороэтилена (PTFE) в случае применения полиоксиданона зафиксировано незначительное врастание эпителиальной ткани в область дефекта.

Известно, что при закрытии дефектов неба микроэпителиальные лоскуты в ходе операций могут сдвигаться к средней линии неба, оставляя оголенными области кости, прилегающие к зубному ряду. В заживлении таких ран принимают участие фибробласты и кератиноциты. Успех заживления определяется степенью контракции раны. В работе (Leenstra et al., 1995) на собаках в опыте длительностью 24 недели оценен эффект применения непористых пленок из 3-ПОБ-со-3-ПОВ для сохранения микропериоста и отделения костных тканей. Через 8 и 12 недель пленки оставались без изменения и были окружены сформированными фиброзными капсулами. Это способствовало нормальному процессу восстановления костных тканей. Результат применения данного сополимера превосходил эффект применения полилактида.

Помимо использования полимерных барьерных мембран для формирования периодонтальных связок, мембраны из ПОА также могут быть применены в качестве матриц для регенерации костных дефектов челюсти. В работе (Kostopoulos and Karring, 1994a) использовали мембраны из сополимера 3-ПОБ-со-3-ПОВ для направленной регенерации костной ткани в месте дефекта нижней челюсти крыс. Наблюдение в течение 180 суток показало, что в месте имплантации полимерной мембраны происходил рост нормальной костной ткани, в то время как у контрольных животных (дефект челюсти оставался открытым) дефект заполнялся костной тканью только на 35–40 %, остальной объем заполнялся другими тканями. Далее авторы, используя полимерные мембраны, показали, что на их основе за 6 мес. дефект полностью заполнился костной тканью у 2/3 крыс. В нескольких случаях, однако, мягкие ткани мигрировали в область имплантата. В результате, рост костной ткани ингибировался (Kostopoulos and Karring, 1994b). Таким образом, в принципе возможно использование ПОА в челюстной восстановительной хирургии, однако для применения их в качестве барьера для мягких тканей необходима модификация мембран.

В работе (Kraamp et al., 2001) для закрытия дефекта незаращенного неба были использованы пленки и пластины из полиоксибутирата, которые с помощью болтов, также изготовленных из ПОБ, прикручивали в месте дефекта (рис. 7.9).

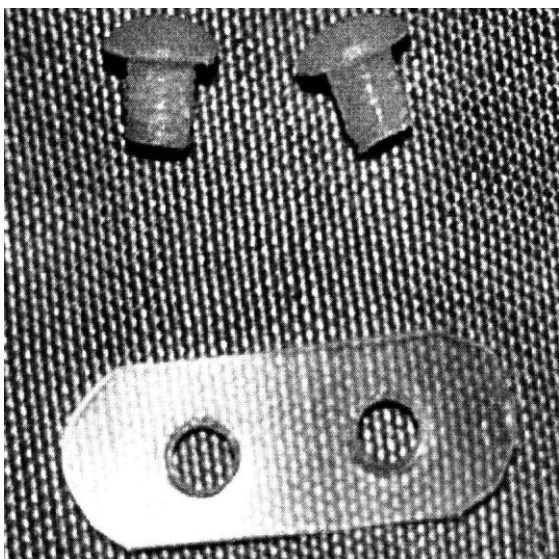


Рис. 7.9. Конструкции из ПОБ для закрытия дефекта неба (Kramp et al., 2001).

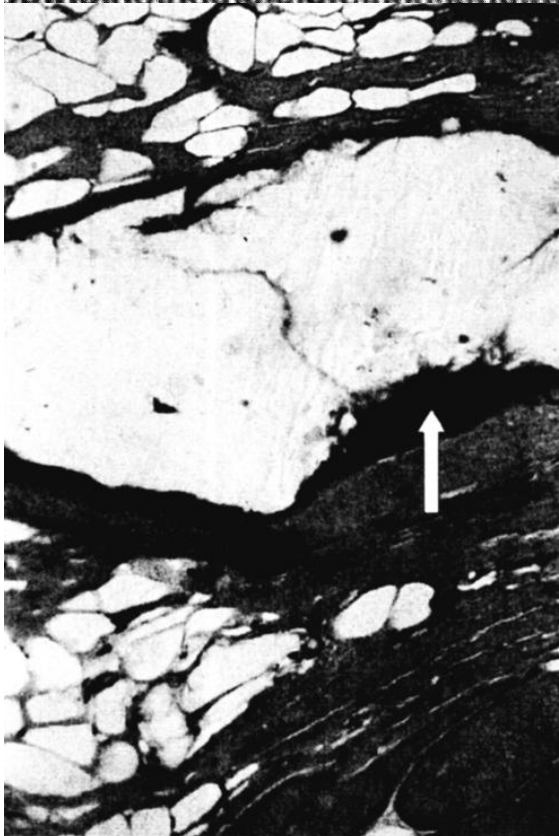


Рис. 7.10. 20 месяцев после имплантации пластины из ПОБ (Kramp et al., 2001).

Приживление всех имплантатов прошло хорошо. Макро- и микроскопически проявления воспаления в месте имплантатов зафиксировано не было. Через 6 месяцев дефекты полностью закрылись регенерированными тканями. При этом следует отметить весьма медленную деструкцию материала пластин. Только спустя 20 и 25 месяцев наблюдали частичную абсорбцию ПОБ (рис. 7.10).

Барьерные мембраны из 3-ПОБ-со-3-ПОВ, усиленные полигликолидными волокнами, были использованы для покрытия зубных имплантатов в опыте на собаках. Для этого мембраны помещали в

зубные лунки сразу после экстракции зубов у животных. Дополнительно в мембрану были введены лекарственные препараты. Незначительная инфильтрация не препятствовала костной регенерации. Спустя 12 недель наблюдали нормальную регенерацию костной ткани. В контроле (полимерная мембрана отсутствовала в лунке) наблюдали недостаточное костное заполнение (Gotfredsen et al., 1994). Сопоставление этих результатов с результатами использования в аналогичных целях мембран из синтетических полигликолидов позволяет надеяться, что мембраны из ПОА в будущем смогут выполнять функцию применяемых в настоящее время зубных мембран из полилактинового компонента.

### **7.1.3. Ортопедия**

ПОА представляют интерес также для восстановительной хирургии костных тканей. Установлена возможность получения механически прочных композитов ПОА с гидроксиапатитом. При этом выявлено, что добавление гидроксиапатита к ПОБ повышает прочностные характеристики полимера (Doyle et al., 1990). Наблюдение в течение 12 месяцев после имплантации такого композита в поврежденные костные ткани показало отсутствие воспалительных реакций и хорошую регенерацию ткани без каких-либо структурных нарушений. Авторы другой работы (Holland et al., 1990a) также показали, что добавление гидроксиапатита улучшает свойства ПОБ, увеличивая пористость матрикса. Остеобласты при контакте с таким материалом, проникая в пористую структуру композита, закрепляются в ней и нормально пролиферируют. Хорошие результаты получены также при смешивании гидроксиапатита с сополимером ПОБ-со-ПОВ. В течение нескольких месяцев после имплантации данного композита лабораторным животным зарегистрировано постепенное снижение молекулярного веса материала (Holland et al., 1990b). По мере формирования пор в матриксе композита скорость биodeградации последнего возрастала; костная ткань при этом нормально развивалась.

ПОБ и сополимеры ПОБ-со-ПОВ, усиленные гидроксиапатитом, исследованы для восстановления костных дефектов конечностей. Показано, что физико-механические характеристики данных композитов близки по прочности костям конечностей и могут быть использованы для изготовления сложных костных протезов, включая моделирование губчато-кортикальных конструкций (Voegge et al., 1993).

Поскольку для ПОА подтвержден пьезоэлектрический эффект, данный материал перспективен для костной регенерации. В этой связи изучены пьезоэлектрические свойства композитов 3-ПОБ-со-3-ПОВ с гидроксиапатитом и 3-ПОБ-со-3-ПОВ со стекловолокном с различным соотношением фракций (Knowles et al., 1991). Обнаружено генерирование пьезоэлектрического потенциала у данных компо-

зитов, по силе, близкому к таковому у кости. Далее эти композиты исследованы в опытах *in vitro* и *in vivo* (Knowles and Hastings, 1993a, b). В системах *in vitro* показано снижение массы композита в результате вымывания стекловолокна.

Аналогичная картина также зафиксирована *in vivo*. Данные композиты были имплантированы крысам подкожно, а также в качестве имплантатов бедра, не несущих нагрузки. В начале была отмечена достаточно интенсивная клеточная активность окружающих тканей, что было обусловлено высвобождением ионов из керамики. Однако в целом ответ тканей был мягким. Со временем клеточная активность снижалась. Через четыре недели пролиферирующие клетки внедрялись в пористую поверхность композита, в котором поры формировались в результате растворения керамики. Далее было отмечено формирование костной ткани на поверхности имплантата. Авторы изучали характеристики сополимеров 3-ПОБ-со-3-ПОВ в композиции со стекловолокном и в сравнении с композитами данного сополимера, усиленного гидроксиапатитом (Knowles et al., 1992). Конструкции, изготовленные из данных композитов, были имплантированы кроликам в бедренные кости и оценены в динамике, включая тесты с использованием механических нагрузок на имплантат. В течение восьми недель наблюдения показано, что приживление композитного имплантата с гидроксиапатитом проходило лучше по сравнению с композитом 3-ПОБ-со-3-ПОВ со стекловолокном. Торможение приживления имплантата и формирования костной ткани авторы обусловили ионами, высвобождаемыми из стеклокомпонента конструкции.

В работе (Jones et al., 2000) сравнивали имплантаты, изготовленные из 3-ПОБ-со-3-ПОВ в композиции с фосфатом кальция с имплантатами из композита фосфата кальция с полилактидом, которые имплантировали подкожно и в бедренные кости животным. В ходе эксперимента установлено, что биодеградация композита с 3-ПОБ-со-3-ПОВ происходила в четыре раза медленнее, чем из полилактида.

Полиоксибутират (ПОБ), усиленный частицами синтетического гидроксиапатита, исследован *in vivo* в качестве заменителя костной ткани в сравнение с нативным ПОБ (Lukinska et al., 1997). Имплантированные в бедренную кость кроликов полимерные конструкции из ПОБ и композита «ПОБ-гидроксиапатит» наблюдали в течение 6 мес. В этой работе также подтверждены преимущества композитного материала для восстановительной костной хирургии, так как при его использовании отмечено эффективное взаимодействие в системе «имплантат – кость». В результате этого по мере деградации ПОБ происходит взаимопроникновение частиц имплантата в костную ткань, а клеток костной ткани – в матрикс полимерного имплантата.

Важные результаты получены в ходе исследования конструкций из ПОА для получения систем доставки антибиотиков длительного действия с целью лечения экспериментального остеомиелита (Türesin et al., 2001). На примере двух антибиотиков (Sulperasone<sup>®</sup> и Duocid<sup>®</sup>), включенных в материал модельных штифтов, изготовленных из разных типов ПОА (сополимеров ЗПОБ-со-4ПОВ и ЗПОБ-со-3ПОВ), исследована в сравнение кинетика выхода антибиотика. Эффективность подобных конструкций далее исследована в опытах на лабораторных животных (Korkusuz et al., 2001). Штифты, изготовленные из смеси сополимеров ПОВ-со-ПОВ различных типов (ЗПОБ-со-4ПОВ и ЗПОБ-со-3ПОВ) и двух антибиотиков (сульперазона и сулбактам-ампициллина) (1:1 по массе) были имплантированы предварительно инфицированным стафилококками кроликам в костномозговой канал правой большеберцовой кости. Животных наблюдали в течение шести недель после операции. В экспериментальных группах, независимо от типа антибиотика, к концу эксперимента наблюдали выздоровление всех инфицированных животных. Подавление воспаления и регенерация тканей происходили на фоне разрушения имплантата и высвобождения из него антибиотиков. В ходе этого процесса активные остеобласты заполняли поры и формировали новую костную ткань. Физико-механические свойства имплантатов, однако, зависели от состава полимерного материала. Так, конструкции из ЗПОБ-со-4ПОВ были более эластичными по сравнению с ЗПОБ-со-3ПОВ. В целом, результаты показали, что свойства ПОА, в т. ч. такие уникальные, как пьезоэлектрические, стимулируют регенерацию костных тканей.

#### **7.1.4. Другие хирургические применения ПОА**

Еще в середине 60-х годов было отмечено, что трубочки, изготовленные из полиоксибутирата, могут быть использованы для восстановления уретры (Baptist and Ziegler, 1965). Возможность применения сополимера ПОВ-со-ПОВ для реконструкции уретры сравнительно недавно была подтверждена в работе (Bowald and Johansson, 1990). Раствор гомополимера ПОВ-со-ПОВ использовали для покрытия тонких тканых викриловых трубочек, которые имплантировали собакам. Спустя 6–9 мес. после операции зафиксировано образование полностью состоятельных тканей уретры у всех животных.

В связи с пьезоэлектрическими свойствами полиоксибутирата он представляет интерес для восстановления нервных тканей. Так, в работах (Borkenhagen et al., 1998) исследованы ПОВ и сополимеры ПОВ-со-ПОВ с различными включениями оксидов в качестве нервопроводящих каналов на крысах. В ходе четырехмесячного эксперимента зафиксирована нормальная регенерация аксона у животных при использовании обоих типов ПОА. В работе (Hazari et.

al.,1999a) исследовали применение ПОА для регенерации поврежденных нервов. Фрагментами нетканого материала, изготовленного из ПОБ и сополимера ПОБ-со-ПОВ, оборачивали предварительно перерезанные нервы на передних конечностях у кошек. Оценивали макрофагальную инфильтрацию и миелинизацию в месте имплантации конструкций. Спустя 6 и 12 месяцев проанализировали состояния нерва и установили восстановление дистального отдела. Количество аксонов, их диаметр и толщина миелина были одинаковыми на обоих сроках. Отмечено статистически достоверное увеличение диаметра нервного волокна через 12 месяцев относительно шести. В другой работе (Nazari et.al.,1999b) авторы оценили эффективность регенерации поврежденных седалищных нервов у крыс, сравнивая имплантацию проводников, изготовленных из ПОБ с аутоотрансплантатами. Предварительно у крыс были иссечены сегменты нерва длиной 10 мм. Состояние нервов оценивали спустя 30 суток после операции. Иммунохимически анализировали наличие специфических белков, количество клеток Шванна, неоваскулиризацию внутри имплантированных проводников, а также участие макрофагов в ответе тканей. Практически по всем показателям проводники, изготовленные из ПОБ, были сопоставимы с нервными аутоотрансплантатами и обеспечивали хорошую регенерацию нервов.

Уже в начале 60-х годов была показана потенциальная применимость полиоксибутирата для получения биodeградируемого шовного материала и пластики мягких тканей (Baptist and Ziegler, 1965). Лоскуты из ПОБ с гладкой поверхностью с одной стороны и пористой – с другой оценены в качестве резорбируемых матриц для восстановления повреждений мягких тканей, в частности, желудочно-кишечного тракта. После установления хорошей адгезии фибробластов на поверхности ПОБ, лоскутами из ПОБ, засеянными фибробластами из тонкой кишки, были закрыты хирургические дефекты желудка у крыс (Behrend et al., 1999). Установлено, что приживляемость лоскута из ПОБ в желудке была лучше, чем лоскуты из викрила. При этом на пористой стороне имплантированного лоскута из ПОБ была отмечена хорошая регенерация тканей желудка и их прорастание в имплантат.

В работе (Webb and Adsetts, 1986) описано применение растворов ПОБ и ПОБ-со-ПОВ в летучих растворителях для покрытия раневых поверхностей, которые после испарения формируют пленку на ране. Это особенно применимо для неотложных состояний. Такие пленки потенциально могут предохранять рану от инфицирования. Описан другой метод использования ПОБ в качестве перевязочного материала (Steel and Norton-Berry, 1986), заключающийся в получении нетканого волокнистого материала и изготовление на их основе тампонов, марли, корпии и других гигроскопических средств.

Сравнительно недавно (Davies and Tighe, 1995) оценили применимость ПОБ в качестве матрицы для регенерации кожи. В культурах эпителиальных клеток человека показана хорошая прикрепляемость и пролиферация клеток на поверхности пленок из ПОБ в специально подобранных средах. Описана имплантация сополимерных пленок из 3-ПОБ-со-4-ПОБ в брюшную полость крыс между разрезом в коже и кишечником для предотвращения развития спаек (Ishikawa, 1997). Через месяц разрез зарубцевался, при этом в месте операции спаяк не обнаружено. Имплантированная полимерная пленка, однако, не абсорбировалась в течение года наблюдений.

## **7.2. Перспективы применения ПОА в фармакологии**

Интерес к ПОА в связи с фармакологическими проблемами значителен. Данному вопросу посвящено несколько обзоров (Holland et al., 1986; Pouton and Akhtar, 1996; Ammas et al., 1998; Scholz, 2000). В фармакологических целях ПОА исследуются в различных качествах (подкожные имплантаты, прессованные таблетированные формы для орального применения и микрочастицы для внутримышечного и внутривенного введения).

### **7.2.1 Таблетированные формы**

На первых этапах полиоксibuтират был исследован в качестве матрицы для приготовления пролонгированных форм препаратов в виде пресованных таблеток на примере 7-гидроксиэтилэфиллина (Korsatko et al., 1983a, b; 1984). В экспериментах *in vitro* и *in vivo* кинетика высвобождения лекарства была линейной, однако скорость высвобождения препарата зависела от соотношения «ПОБ-лекарство» и увеличивалась с уменьшением доли полимера. Также установлено, что скорость высвобождения препарата из подкожных имплантатов *in vivo* была в 2–3 раза ниже, чем *in vitro*. Далее авторы изучили влияние молекулярной массы ПОБ на кинетику высвобождения лекарства и установили, что с увеличением молекулярной массы полимера от 3 000 до 600 000 Da высвобождение препарата из пресованных таблеток возрастало (Korsatko et al., 1987). Показана возможность создания на основе ПОБ пролонгированных форм кофеина (Mank et al., 1989a–c), высокомолекулярных пептидных и гормональных препаратов с контролируемой скоростью высвобождения препаратов (Korsatko-Wabnegg et al., 1990; Gangrade, Price, 1991).

Сравнительное исследование сополимера ПОБ-со-ПОВ показало, что с уменьшением доли оксивалерата скорость высвобождения препарата усиливается. Это связано с тем, что в процессе прессования сополимера, чем меньше в нем валерата, тем более рыхлыми

получаются таблетки и, следовательно, более проницаемыми для жидкостей (Gould et al., 1987). Полимерные диски, полученные прессованием из расплава ПОБ, исследованы для включения различного количества 5-флюороурацила (Juni and Nakano, 1987). Кинетика высвобождения препарата из данных форм исследована *in vitro*; при этом показано, что скорость высвобождения препарата зависит от его содержания в форме. Полное высвобождение препарата наблюдали через пять суток при 50 % содержании препарата в форме. Данный метод приготовления дисков был опробован на сополимере ПОБ-со-ПОВ, имеющем более низкую по сравнению с ПОБ температуру плавления (Gangrade and Price, 1992). В качестве лекарственного средства использован прогестерон в смеси с полимером (доля препарата составляла от 5 до 50 %). Аналогично другим исследованиям в данной работе показано, что скорость высвобождения лекарства возрастает с увеличением его содержания в препарате.

Для лечения эндофитных инфекций у крупного рогатого скота созданы ушные имплантаты на основе ПОБ-со-ПОВ с включением метоклопрамида, которые готовили прессованием из расплава сополимера (Jones et al., 1994). Спресованные из расплавов ПОБ компакты с включением тетрациклина исследованы для лечения периодонтитов (Collins et al., 1989; Deasy et al., 1989). Предварительно *in vitro* была оптимизирована кинетика высвобождения антибиотиков, и созданы формы с высвобождением терапевтических доз антибиотика в течение 8-9 суток. Далее 6 пациентов с гингивитами были подвергнуты лечению данными лекарственными формами. В течение десятидневного лечения анализировали концентрацию тетрациклина в слюне пациентов. В ходе лечения наступило улучшение; наблюдаемое воспаление было оценено от умеренного до слабого. Однако после прекращения лечения улучшенное состояние не сохранилось. Аналогичные формы ПОБ были получены с включением гонадотропного гормона, контролирующего высвобождение и кинетику секреции лютеинизирующего гормона, который обеспечивает овуляцию. Эффективность препарата исследована *in vivo* на овцах, которым вшили по два подкожных имплантата с гормоном (McLeod et al., 1988). По сравнению с жирорастворимой формой гормона тестируемые формы на основе ПОБ, содержащие 40–50 мг гормона, обеспечили в течение двух – трех дней постепенно повышающийся уровень лютеинизирующего гормона в плазме и высокую частоту овуляции.

На примере модельного препарата (метилового красного) оценена кинетика его высвобождения из пленок ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, полученных прессованием из расплава и методом полива из раствора (Akhtar et al., 1989; 1991; 1992). Было выявлено, что в быстро кристаллизующийся ПОБ метиловый красный включался более эффективно



по сравнению с медленно кристаллизующимся сополимером ПОБ-со-ПОВ и также более медленно высвобождался в условиях *in vitro*.

В работе Харенко и Иорданского (Kharenko and Iordanskii, 1999) были приготовлены таблетки из ПОБ, содержащие вазодилататор дилтиазем (до 40 % по массе), высвобождение которого оценено *in vitro*. Практически полный выход препарата наблюдали при его высокой нагрузке в форме; при низких включениях лекарства скорость его выхода падала.

### **7.2.2. Микроинкапсулирование и носители лекарств на основе ПОА**

В связи с активно развивающимся в настоящее время новым направлением в фармакологии – микроинкапсулированием, к ПОА, подверженным переработке различными методами из различных фазовых состояний и медленно деградируемым в биологических средах в отличие от полилактоидов и полигликолидов, возник большой интерес (Pouton, Akhtar, 1996; Kassab et al., 1997). Следует отметить, что первые способы инкапсулирования растворимых пептидов в микрокапсулы из полиоксибутирата, а также его композитов с полилактидами были запатентованы во второй половине 80-х гг. (Bissery et al., 1983; 1984a; Sandow, Seidel, 1986; 1989).

Получение микрочастиц возможно различными методами, в т.ч. испарением растворов. В ходе отработки технологии варьируют соотношение носителя и лекарства, типы полимеров, их молекулярный вес, скорость кристаллизации, добавки. Получаемые частицы различаются формой, размерами и структурой поверхности.

Наиболее изученными в этом плане являются полиоксибутират и его сополимеры с оксивалератом (Kassab et al., 1997; Ammas et al., 1998; Gürsel et al., 2000). При этом выявлено, что

- с увеличением оксивалерата в ПОБ-со-ПОВ скорость высвобождения лекарства обычно замедляется, однако микрочастицы, полученные на основе ПОБ, более хрупкие по сравнению с таковыми из сополимерного материала;
- с уменьшением размера частиц снижается их нагрузочная по отношению к лекарству способность, однако скорость высвобождения препарата возрастает;
- величина молекулярной массы полимера влияет на скорость выхода лекарства незначительно;
- выход лекарств из ПОБ и ПОБ-со-ПОВ происходит в результате диффузии, значительно ранее начала деградации собственно полимерного носителя;
- чем ниже содержание препарата в микрочастицах, тем ниже скорость его высвобождения.

Одно из самых ранних исследований микросфер из ПОА выполнено (Bissery et al., 1983; 1984). Методом испарения растворителя из раствора ПОБ, меченого по  $^{14}\text{C}$ , были получены микросферы диаметром 1–12 мкм, которые после внутривенного введения мышам локализовались в основном в легких. При введении таких микросфер, нагруженных протовораковым препаратом (ломустином), мышам с карциномой легких Левиса, эффект препарата был минимальным (Bissery et al., 1985). Однако в системах *in vitro* обнаружено, что лекарство полностью высвобождается из микросфер за 24 ч. при содержании препарата в частицах 7.4 % (по массе) в отличие от полилактидных микросфер, для высвобождения препарата из которых требуется до 90 ч. (Bissery et al., 1984b). В ходе приготовления микросфер возможна гетерогенность их формы, что, возможно, обусловлено высокой кристалличностью полиоксибутирата.

Локализация гранул, полученных из меченого по  $^{14}\text{C}$ -полиоксибутирата, изучена при введении лабораторным животным внутривенно. Показано, что в зависимости от размера гранул они локализовались в разных внутренних органах. При введении частиц диаметром 1–12 мкм внутривенно мышам спустя 30 мин. 47 % от общей радиоактивности было зарегистрировано в легких, 14 % – в печени и 2.1 % – в селезенке. Введение более мелких частиц (0.3–0.5 мкм) в хвостовую вену крысам дало иную картину, – через 2.5 ч. 86 % радиоактивности зафиксировано в печени и только по 2.5 % в легких и селезенке. Радиоактивность тканей регистрировали в течение двух месяцев при медленном, но заметном ее снижении (Saito et al., 1991)

Исследование кинетики выхода лекарства из микросфер разного диаметра (53–2000 мкм), полученных из ПОБ, проведено на примере сульфамитизола. Установлено, что из микросфер, полученных из кристаллического ПОБ более высокой молекулярной массы, скорость выхода препарата выше, вероятно, вследствие неравномерного включения лекарства в полимерный матрикс (Brophy and Deasy, 1986). Увеличение скорости выхода препарата положительно коррелировало с содержанием лекарства в форме и возрастало с уменьшением размеров частиц.

Исследовано включение антибиотиков антрациклинового ряда в микросферы из полиоксибутирата и кинетика их выхода *in vitro* в зависимости от размера частиц и содержания в них лекарства (Juni and Nakano, 1987; Kawaguchi et al., 1992). На скорость выхода лекарства из полимерных микрочастиц, как установлено (Kubota et al., 1988), влияет также дополнительное введение в форму эфиров жирных кислот. Последние, формируя каналы в объеме микросферы, облегчают высвобождение лекарства. Это подтверждено на примере микросфер из ПОБ с включением ацилглицерола для высвобождения противоракового препарата ластета (Abe et al., 1992). Хороший про-

тивоопухолевым эффектом против P388 лейкемии показан при испытании микросфер из ПОб *in vivo* (Kawaguchi et al., 1992).

Показана возможность использования ПОб для приготовления оральных лекарственных систем с целью доставки вакцин, способных защищать антигены вакцин от перевариваемости в желудке (Eldrige et al., 1990). Проведено испытание микросфер диаметром менее 10 мкм, содержащих кумарин, *in vivo* в опыте на мышах при однократном оральном введении. Результаты показали хорошую абсорбцию микросфер в Пейеровых бляшках спустя 48 ч. после потребления. ПОб и ПОб-со-ПОВ как матрица для разработки средств доставки вакцин также положительно оценены другими авторами (Linhardt et al., 1990; Conway et al., 1996;1997).

Собственно полиоксибутират и в смеси с рифампицином в экспериментах *in vivo* на собаках оценены в качестве носителя для изготовления эмболов почечных артерий (Kassab et al., 1997;1999). Полученные ангиограммы до и после эмболизации показали, что введение микросфер диаметром от 120 до 200 мкм в количестве 10 мг/животное обеспечивало замедление кровотока в почечных артериях с последующей частичной окклюзией прекапилляров. После второй инъекции микросфер была достигнута полная эмболизация. Гистологические исследования тканей почек выявили наличие обструкции почечной артерии и блокирование доставки крови к почке.

Описано использование ПОб-со-ПОВ для изготовления микросфер с включением тетрациклина и его гидрохлорида для лечения периодонтитов (Sendil et al., 1998;1999). В зависимости от соотношения полимера и антибиотика удавалось пролонгировать доставку препарата до 100 ч. При этом обнаружено, что изменение молекулярной массы полимера могло влиять на кинетику выхода антибиотика.

Микроинкапсулирование признано наиболее перспективным направлением в области управляемой доставки лекарственных веществ (Duarte et al., 1997; Amass et al., 1998). Применение ПОА и микроинкапсулирования для создания пролонгированных лекарственных средств в настоящее время признано пригодным для многих применяемых в настоящее время лекарственных средств. В зависимости от техники инкапсулирования содержание препарата в микросферах может существенно варьировать. В настоящее время ПОА активно исследуются в качестве биodeградируемой матрицы для получения микрокапсул (Abe, Doi, 1992; Kumagai, Doi, 1992; Embelton, Tighe, 1992; 1993; Gref et al., 1994; Gursel, Hascisci, 1995; Atkins, 1997; Kim et al., 2000; Kamaev et al., 2001). Описаны различные модельные микрокапсульные системы длительного пользования на основе ПОА для доставки гормональных, противораковых, седативных препаратов, антибиотиков и др. (Gürsel et al., 2000; Lu et al., 2001; Kang et al., 2001).

Среди различных типов полиоксиалканоатов, которые идентифицированы к настоящему времени, полимеры, содержащие в качестве мономеров 4-оксимасляную кислоту, представляют интерес в качестве источника данных мономеров для биомедицинских применений. Потенциальное терапевтическое значение 4-оксимасляной кислоты было установлено в начале 60-х годов (Dean et al., 1998). Данный мономер оксимасляной кислоты, называемой в медицинской практике  $\gamma$ -оксибутиратом, способный быстро проникать через гематоэнцефалический барьер и вызывать сонноподобное состояние при сохранении стабильности сердечно-сосудистой системы, стали использовать в качестве внутривенного анестезирующего средства в Европе и Японии (Laborit, 1964; Hunter et al., 1971). Далее 4-оксибутират стали применять в качестве нарколептика, так как он удлиняет обе фазы сна и поддерживает данный эффект на протяжении ночи (Mamelak et al., 1986).

Исследования 4-оксимасляной кислоты в виде солей натрия проведено с целью использования в анестезиологии (Vickers, 1968). Установлено, что применение солей 4-оксимасляной кислоты в виде таблетированных и капсульных форм орально невозможно из-за высокой гигроскопичности. Поэтому были начаты исследования, направленные на создание приемлемых лекарственных форм 4-оксимасляной кислоты (Klosa, US Patent 282,419). Имеется несколько патентов применения 4-оксимасляной кислоты в качестве снотворного средства и для лечения алкогольного абстинентного синдрома.

Выявлено, что 4-оксимасляная кислота повышает уровень дофамина в тканях мозга (Gessa et al., 1966). В связи с этим эффектом запатентовано применение 4-оксимасляной кислоты в виде форм с контролируемым высвобождением кислоты для лечения алкоголизма, а также героиновой и никотиновой зависимости. Более того, выявлено, что 4-оксибутират способен сокращать потребности в энергетических субстратах тканей мозга и периферических тканей, поэтому может выполнять роль протектора данных тканей от повреждений при гипоксических и других патологических состояниях (Mamelak, 1989).

С целью увеличения коммерческого выпуска 4-оксимасляной кислоты в качестве ее источника оценены полиоксиалканоаты, содержащие 4-оксимасляную кислоту в качестве мономера (Williams and Martin, 2001). Авторы дозированно вводили низкомолекулярный 4-ПОБ через назогастральный зонд крысам и регистрировали после этого концентрацию мономеров 4-оксимасляной кислоты в сыворотке животных. Спустя 30 мин после введения концентрация мономеров в сыворотке возросла от базовой концентрации (9  $\mu\text{M}$ ) до 86  $\mu\text{M}$  и сохранялась на этом уровне в течение восьми часов. В отличие от введения полимера, введение мономеров 4-оксимасляной кислоты приводило к быстрому (через 30 минут) увеличению их концентрации

в сыворотке до 182  $\mu\text{M}$ , однако спустя два часа концентрация мономеров падала до базового уровня. Замедленный выход мономеров из 4-ПОБ потенциально можно использовать для лечения нарколепсии, алкогольной зависимости и др. Терапевтический потенциал 4-ПОБ в настоящее время активно исследуется (Sudesh et al., 2000).

### **7.3. Возможные сферы применения полиоксиалканоатов**

К 2000 году объемы производства разрушаемых пластиков должны были достигнуть 1.4–2.0 млн тонн. Предназначены они, в основном, для изготовления упаковочного материала и тары для бытовых отходов, пищевой промышленности, косметологии, а так же сельского хозяйства. Большой интерес к биodeградируемым пластикам, в частности, полиоксиалканоатам в настоящее время сложился в США. Хорошие перспективы и широкий рынок изделий из ПОА наметился в косметологии. Это получаемые экструзией различной формы флаконы, банки, бутылки, контейнеры и коробки (Baptist, 1963a, b). Применяют полиоксиалканоаты также для изготовления пишущих ручек, игрушек, спортивных изделий (Webb, 1990).

Отдельные полиоксиалканоаты образуют прочные гели и латексы. На их основе возможно изготовление клеев, наполнителей, в т.ч. для стабилизации красителей (Taylor, 1996). Ламинаты ПОА с бумагой и другими полимерами хорошо зарекомендовали себя для изготовления мешков и пакетов для хранения разрушаемого мусора, а также одноразовой посуды (Marschssaultt et al., 1995). Хорошие ламинаты ПОА получают в смеси с другими полимерами, например, поливиниловым спиртом (Holmes, 1986). Такие композиционные материалы быстро разрушаются в компостах и почве (Noda, 1996a, b; Shiotani, Kobayashi, 1994). Расплавами полиоксиалканоатов возможно ламинирование бумаги и картона (Kazuuya et al., 1994). Из ПОА можно производить нетканые материалы (Steel, Norton-Berry, 1986), различные предметы личной гигиены, включая памперсы, прокладки, салфетки, тампоны и пр. (Martini et al., 1989a, b)

Полиоксибутират и его сополимеры с валератом используют для получения термopлавких адгезивных материалов (Kauffman et al., 1992), а длинноцепочечные ПОА используют в качестве адгезивов, устойчивых при прессовании (Rutherford et al., 1997). ПОА можно использовать также для замены нефтехимических полимеров в качестве тонеров и проявителей (Fuller et al., 1991), а также ион-проводящих полимеров (Reusch and Reusch, 1993a,b).

Помимо упаковочной тары, контейнеров для пищи и одноразовой посуды, ПОА используют также в качестве пищевых добавок, на-

пример, заменителя сливок, средств доставки ароматизаторов и отдушек (Yalpani, 1993a, b).

Данный материал исследуется и внедряется в различные сферы, включая необычные, например, использование в условиях морской воды. Это направление возникло после того, как стало известно, что ПОА хорошо разрушаются не только в почве, но и в морской воде. Моножильные крученые нити из сополимеров ПОБ-со-ПОВ используются для изготовления рыболовных сетей, крабовых ловушек, канатов, а также в практике морской аквакультуры (Inagaki et al., 1996; Sim et al., 1997). Данные изделия достаточно прочны и в то же время разрушаются в морской воде. Биodeградируемые пленки из Биопола®, покрытые поливинилом, используются для выращивания морских водорослей. Такие изделия сохраняют исходные прочностные свойства в течение трех месяцев (Hamada, 1997), а смеси поликапролактона с ПОБ-со-ПОВ препятствуют прикреплению водорослей в ходе эксплуатации, тем самым создавая условия для выращивания морской фауны для получения морепродуктов (Suzuki et al., 1996).

Рынок существует и по отношению к продуктам деполимеризации и гидролиза ПОА. Из полиоксиалканоатов возможно получение спектра оптически чистых многофункциональных оксикислот (Lee et al., 1997; 1998). Фирма Merck, например, использует гидролизаты R-3-оксимасляной кислоты для получения антиглаукомных препаратов, а также в композиции с R-1,3-бутандиолом – для получения β-лактама (Stinson, 1995).

Обсуждаются и потенциальные питательные свойства полиоксиалканоатов. Несколькими исследовательскими группами в ходе исследования ряда нарушений обмена, например, метаболического ацидоза, в качестве альтернативы мономерам натриевых солей оценены мономеры R-3-полиоксимасляной кислоты и их пищевой и терапевтический потенциал. Используя такие полимерные формы вместо натриевых солей, можно контролировать выход мономеров из них, особенно это важно в случаях наличия высоких уровней ионов натрия *in vivo*. В работе (Tasaki et al., 1998) описан результат инфузии димеров и тримеров R-3-полиоксибутирата крысам. Результат был также положителен. Хотя смесь данных компонентов не гидролизовалась в сыворотке, мономеры высвобождались со временем так же хорошо в гомогенатах печени, как после инфузии у крыс. В условиях *in vitro* мономеры также хорошо высвобождались в ходе инкубирования в присутствии карбоксилэстераз.

В серии работ (Veech, 1998; 2000; Martin et al., 2000) при исследованиях олигомеров R-3-гидроксибутирата *in vivo* наблюдали связывание кетоновых тел после пролонгированного периода. Потенциальное использование таких систем доставки может иметь место для контроля приступов, восстановления белкового катаболизма, подав-

ления аппетита, контроля нарушений метаболизма, в качестве парентерального питания, стимуляции сердечной деятельности, при диабете, для контроля поврежденных клеток мозга при болезни Альцгеймера, эпилепсии и нейродегенеративных нарушениях. Потенциальное использование двух типов полиоксиалканоатов, ПОБ и ПОБ-со-ПОВ, исследовано *in vivo*. В самых ранних исследованиях данных полимеров было показано, что ПОБ переваривается *in vivo* крысами и свиньями (Brune and Niemann, 1977а, б). Позднее, была сопоставлена переваримость нативного ПОБ и предварительно обработанного NaOH. Была установлена лучшая переваримость обработанного полимера (Forri et al., 1999 a,b). Разрушение ПОБ в рубце крупного рогатого скота отмечал также в своей работе (Holmes, 1988). Переваримость ПОБ и сополимера ПОО-со-ПОГ изучена у бройлерных цыплят и показано, что количество высвобождаемой из этих полимеров энергии лежит между полисахарами и жирами (Peoples et al., 1999).

## Заключение

Полиоксиалканоаты (ПОА) – природные полиэфиры алкановых кислот, продуцируемые природными микроорганизмами и трансгенными организмами, обладают вариабельностью состава и спектром ценных коммерческих свойств. В силу этого ПОА имеют широкие перспективы применения в различных сферах, прежде всего, в различных областях медицины, а также фармакологии. ПОА по ряду физико-химических свойств сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и неразрушаемыми в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Однако помимо термопластичности, полиоксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, биоразрушаемостью и биосовместимостью. Полиоксиалканоаты чрезвычайно различаются между собой по структуре и свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более того, продемонстрированные возможности получения на основе ПОА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющие направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность, температурные и другие характеристики, еще более усиливает привлекательность ПОА и расширяет возможные сферы применения.

Линейная структура молекул ПОА придает им свойство термопластичности. При нагревании молекулярные цепи в ПОА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов получать из полиоксиалканоатов разнообразные изделия и материалы.

Биодеградируемость и биосовместимость открывают широкие перспективы ПОА для применения в фармакологии и медицине, остро нуждающейся в настоящее время в связи с развитием трансплантологии и тканевой инженерии в функциональных и биосовместимых материалах. Несмотря на то, что активные биомедицинские исследования полиоксиалканоатов развернуты сравнительно недавно, уже сейчас убедительно продемонстрирован их высокий потенциал для применения в сердечно-сосудистой хирургии и трансплантологии, ортопедии и урологии, челюстно-лицевой хирургии и фармакологии.



Таким образом, ценные медико-биологические свойства полиоксисилканоатов, прежде всего биосовместимость и биоразрушаемость, разнообразие состава и в силу этого вариабельность физико-химических и технологических свойств, возможность получения различными биотехнологическими методами и переработки в специальные изделия медицинского назначения определяют широту и разнообразие реальных и потенциальных возможностей биомедицинского использования. Все это указывает на необходимость дальнейших, более глубоких и разносторонних исследований данного интереснейшего биоматериала.

## Литература

- Адамян А. А. Основные направления и перспективы в создании и клиническом применении полимерных имплантатов // Биосовместимость. – 1994. – № 2. – С. 97–107.
- Базаров И. П., Геворкян Э. В. Статистическая физика жидких кристаллов // М.: Изд. – во МГУ. – 1992. – 496 с.
- Безбородов А. М. (Поли-β-оксимасляная кислота // В кн. Биотехнология продуктов микробного синтеза. Москва: Агропромиздат. – 1991. – С. 32–42.
- Белова Л. Л., Соколов А. П., Троценко Ю. А. Метаболические изменения у факультативного метилотрофа *Methylobacterium extorquens*, синтезирующего полиоксибутират // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33. – С. 80–83.
- Беляев Б. А., Дрокин Н. А., Тюрнев В. В., Шепов В. Н. СВЧ-ячейка для измерения диэлектрической проницаемости жидкости // Авт. свид. на полезную модель № 95106068. – БИ. – 1997 – № 3.
- Беляев Б. А., Волова Т. Г., Дрокин Н. А., Шепов В. Н. СВЧ-диэлектрическая проницаемость полиоксибутирата – деградируемого полимера // Докл. РАН. – 2000а. – Т. 370. – № 6. – С. 828–831.
- Беляев Б. А., Волова Т. Г., Дрокин Н. А., Шепов В. Н. Исследование СВЧ-диэлектрической проницаемости в диапазоне сверхвысоких частот деградируемого биополимера полиоксибутирата // Биофизика. – 2000. – Т. 45. – вып.4. – С. 636–640.
- Беляев Б. А., Волова Т. Г., Дрокин Н. А., Шепов В. Н. Микрополосковые резонансные датчики для диэлькометрии жидких кристаллов и биополимеров. Тезисы Второй Международной научно-технической конференции // Барнаул. – 2001. – С. 30–35.
- Беляев Б. А., Волова Т. Г., Дрокин Н. А., Шепов В. Н. Диэлектрическая проницаемость растворов полиоксиалканоатов // Известия ВУЗов. Серия «физика». – 2002. – № 4. – С. 63–68.
- Биодеструктурирующие полимерные материалы. Сб. научн. трудов // Киев: Наукова думка –1982.–88 с.
- Биосовместимость. Под ред В. И. Севастьянова // М.: ИЦ ВНИИгеосистем. – 1999. – 368 с.
- Бонарцева Г. А. Тестирование активности клубеньковых бактерий по накоплению поли-β-оксибутирата при витальном окрашивании их колоний фосфином 3R // Микробиология. – 1985. – Т. 54. – С. 461–464.
- Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Мишустин Е. Н. Показатели активности клубеньковых бактерий. Изв. АН СССР. сер. биол. – 1988. – Т. 4. – С. 546–557.

- Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Загреба Е. Д. Зависимость содержания поли-β-оксибутирата от активности нитрогеназы и гидрогеназы у некоторых штаммов *Rhizobium* // Микробиология. – 1989. – Т. 58. – С. 920–922.
- Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Загреба Е. Д. Содержание поли-β-оксибутирата в клетках видов *Rhizobium* в зависимости от источника углерода и азота в среде // Микробиология. – 1994. – Т. 63. – С. 78–84.
- Васин С. Л., Титушкин И. А., Прокопенко Р. А., Розанова И. Б., Севастьянов В. И. Методика получения и цифровой обработки изображений адгезированных клеток // Медицинская техника. – 1998. – № 1. – С. 6–9.
- Веденов А. А. Физика растворов // М.: Наука. – 1984. – 108 с.
- Вильямс Д., Рауф Р. Имплантаты в хирургии. М.: Медицина. – 1978.
- Волова Т. Г., Федорова Я. В., Калачева Г. С. Влияние лимитирования роста на накопление полиоксибутирата у водородокисляющих бактерий // В кн.: Материалы Всес. конф. Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов. Пушино. – 1989. – С. 16–24.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С. Полиоксибутират – термопластичный биodeградируемый полимер (получение, свойства, применение). Красноярс. Препринт 131Б – 1990. – 47 с.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Федорова Я. В. Регуляция синтеза микробного полиоксибутирата параметрами среды // В сб.: Микробная биоконверсия. Рига. – 1990. – С. 119–129.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Константинова В. М., Пузырь А. П. Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992а. – Т. 28. – С. 221–22.
- Волова Т. Г., Луковенко С. Г., Васильев А. Д. Получение и исследование физико – химических свойств микробных полиоксиалканоатов // Биотехнология. – 1992б. – № 1. – С. 19–22.
- Волова Т. Г., Константинова В. М., Гусейнов О. А. Образование термопластичных разрушаемых полиоксиалканоатов хемолитотрофными бактериями // Биотехнология. – 1992в. – № 5. – С. 81–83.
- Волова Т. Г., Луковенко С. Г., Васильев А. Д. Получение и исследование физико – химических свойств микробных полиоксиалканоатов // Биотехнология. – 1994а. – №1. – С. 19–22.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Константинова В. М. Накопление полиоксибутирата аэробной СО – окисляющей карбоксидобактерией *Seliberia* // Микробиология. – 1994б. – Т. 63. – С. 211–216.
- Волова Т. Г., Терсков И. А., Сидько Ф. Я. Микробиологический синтез на водороде // Новосибирск: Наука. – 1995. – 115 с.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С. Способ получения полимера β-оксимасляной кислоты // Патент РФ № 2051967. – БИ. – 1996. – № 3.

- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Константинова В. М. Способ получения гетерополимера  $\beta$ -оксимасляной и  $\beta$ -оксивалериановой кислот. Патент РФ // № 2051968 (приоритет от 08.01.1992). – БИ. – 1996а. – № 3.
- Волова Т. Г., Гительзон И. И., Пузырь А. П. Размерная гетерогенность в бактериальной популяции, аккумулирующей и деградирующей полиоксибутират // Докл. РАН. – 1996б. – Т. 346. – С. 256–258.
- Волова Т. Г., Беляева О. Г., Калачева Г. С., Плотников В. Ф. Получение и исследование микробных гетерополимерных полиоксиалканоатов // Докл. РАН. – 1996в. – Т. 346. – С. 558–561.
- Волова Т. Г., Беляева О. Г., Плотников В. Ф., Пузырь А. П. Исследование разрушаемости микробных полиоксиалканоатов // Докл. РАН. – 1996. – Т. 350. – С. 498–501.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Пузырь А. П. Влияние внутриклеточного пула полиоксибутирата на рост водородных бактерий в неоптимальных условиях // Микробиология. – 1996д. – Т. 65. – С. 594–598.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Плотников В. Ф. Биосинтез гетерополимерных полиоксиалканоатов хемолитотрофными бактериями // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – С. 512–517.
- Волова Т. Г., Беляева О. Г., Плотников В. Ф., Пузырь А. П. Исследование разрушаемости микробных полиоксиалканоатов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 539–543
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Трусова М. Ю., Тюлькова Н. О., Пузырь А. П. Исследование внутриклеточной деградации полиоксибутирата в культуре водородных бактерий // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – С. 72–78.
- Волова Т. Г., Васильев А. Д., Зеер Э. П., Петраковская Э. А., Фалалеев О. В. Исследование молекулярной структуры полиоксибутирата – термопластичного разрушаемого биополимера // Биофизика. – 2000. – Т. 45, вып. 3. – С. 433–439.
- Волова Т. Г., Шишацкая Е. И., Гордеев С. А., Зеер Э. П. Исследование структуры и свойств полиоксибутирата – термопластичного биоразрушаемого полимера // Перспективные материалы. – 2001. – № 2. – С. 40–48.
- Волова Т. Г., Калачева Г. С., Алтухова О. В. Автотрофный синтез полиоксиалканоатов бактериями *Alcaligenes eutrophus* в присутствии моноокси углерода // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 745–752.
- Волова Т. Г., Войнов Н. А. Кинетические параметры культуры водородокисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* в режиме биосинтеза полигидроксибутирата // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 2. – С. 166–170.
- Волова Т. Г., Шишацкая Е. И., Некрасов Ю. П., Гордеев С. А. Получение и исследование пленок и шовных нитей из полиоксиалканоатов // Пластические массы. – 2003. – № 3. – С. 6–8.

- Волова Т. Г., Войнов Н. А. Кинетические и продукционные характеристики культуры *Ralstonia eutropha*, аккумулирующей полигидроксиалканоаты на продуктах переработки углей // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – (в печати).
- Волова Т. Г., Гительзон И. И., Калачева Г. С., Кузнецов Б. Н., Шабанов В. Ф. Способ получения полимера  $\beta$ -оксимасляной кислоты // Патент РФ № 2207375 (приоритет от 27.02.2001).
- Волошин А. И., Шехтер А. Б., Попов В. К. Тканевая реакция на акриловые пластмассы, модифицированные сверхкритической экстракцией двуокисью углерода // Стоматология. – 1998, – № 4. – С.4–9.
- Волохина А. В., Годовский Ю. К., Кудрявцев Г. И. и др. Жидкокристаллические полимеры // М.: Химия. – 1988. – С. 7.
- Воспаление. Руководство для врачей. Под. ред. В. В. Серова и В. С. Паукова // М.: Медицина. – 1995. – 629 с.
- Галатенко Н. А., Яценко В. П., Пхакадзе Г. А., Липатова Т. Э. Определение гистотоксичности полимеров медицинского назначения с использованием тканевых культур // Доклады АН УССР. Серия Б.– 1982. – Т. 9. – С. 52–56.
- Говорухина Н. И., Троценко Ю. А. Содержание поли- $\beta$ -оксибутирата у мезофилотрофных бактерий с различными путями первичной ассимиляции метанола // Прикладная биохимия и микробиология. –1991. – Т. 27. – С. 98–101.
- Горчаков В. Д., Сергиенко В. И., Владимиров В. Г. Селективные гемосорбенты. М.: Медицина. – 1989.
- Доронина Н. В., Остафим М., Троценко Ю. А. *Methylobacterium extorquens* – новый факультативный метилотроф, образующий поли- $\beta$ -гидроксибутират // Микробиология. – 1992. – Т. 61. – С. 678–682.
- Заварзин Г. А. Литотрофные микроорганизмы // М: Наука. – 1972. – 340 с.
- Заварзин Г. А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии // М: Наука. – 1975. – 202 с.
- Загреба Е. Д., Эйбус Я. А., Якобсон Ю. О. К вопросу об интерпретации инфракрасных спектров поглощения целых микробных клеток // Биофизика. – 1980. – Т. 25. – С. 172–173.
- Загреба Е. Д., Селиверстова Т. И., Гиновская М. К., Клинкаре А. Я., Якобсон Ю. О. Дифференциация штаммов *Rhizobium leguminosarum* методом ИК – спектроскопии // Изв. АН СССР. Сер.биол.наук – 1982. – Т. 6. – С. 906–911.
- Загреба Е. Д., Савенкова В. В., Гиновская М. К., Якобсон Ю. О. ИК-спектроскопический контроль химического состава биомассы // В сб.: Микробная конверсия. Рига. – 1991. – С. 139–147.
- Де Жен П.–Ж. Смачивание: Статика и динамика // Успехи физических наук. – 1987. – Т. 151, вып. 1. – С. 619–681.

- Джеймс Т. Теория фотографического процесса // Л.: Химия. – 1980.
- Искусственные органы. Под ред. В. И. Шумакова // М.: Медицина. – 1990.
- Папков С. П. Студнеобразное состояние полимеров // М.: Химия. – 1974.
- Кацарава Р. В., Харадзе Д. П., Кирмелишвили Л. И., Заалишвили М. М. Гетероцепные полимеры на основе природных аминокислот: Оксазолиновый метод синтеза полиамидов, содержащих ферментативно расщепляемые связи в основных цепях макромолекулы // *Acta Polymerica*. – 1985. – V. 36. – P. 29–38.
- Козловский А. Г., Желифонова В. П., Винокурова Н. Г., Антипова Т. В., Иванушкина Н. Е. Изучение биодеградации поли-β-гидроксibuтирата микроскопическими грибами // *Микробиология*. – 1999. – Т. 68. – С. 340–346.
- Кондратьева Е. Н. Хемотрофы и метилотрофы // изд-во МГУ – 1989. – 176 с.
- Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов // М.: Наука. – 1981. – 344 с.
- Кондратьева Е. Н., Красильникова Е. Н. Фототрофные бактерии как продуценты поли-β-гидроксibuтирата // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1989. – Т. 25. – С. 785–789.
- Короткова Н. А., Доронина Н. А., Троценко Ю. А. // В кн.: тез. конф. Биосинтез и деградация микробных полимеров. Пушино.–1997. – С. 31.
- Короткова Н. А., Ашин В. В., Доронина Н. В., Троценко Ю. А. Определение поли-3-оксibuтирата и сополимера 3-оксibuтирата-3-оксивалерата в микробной биомассе методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1997. – Т. 33. – С. 339–343.
- Короткова Н. А., Доронина Н. В., Троценко Ю. А. Биосинтез сополимера 3-гидроксibuтирата/3-гидроксивалерата метилобактериями с сериновым путем метаболизма // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1997. – Т. 33. – С. 397–402.
- Костюков В. И., Лопатов Ю. С., Яншевский А. В. и др. Имплантаты на основе углерода в травматологии и ортопедии. // В сб. Конструкционные углеродные материалы. М.: Металлургия. – 1985. – С. 100–103.
- Лопатин В. Н., Волова Т. Г., Шаповалов К., Щур Л. А. Оптические характеристики клеток водородных бактерий, аккумулирующих полиоксибутират // *Журнал прикладной спектроскопии*. – 1996. – Т. 63. – С. 404–440.
- Липатова Т. Э., Пхакадзе Г. А. Применение полимеров в хирургии. – Киев.: Наукова думка. – 1977. – 132 с.
- Михалковский С. В., Алексеева Т. А., Носков А. М. и др. Иммуносорбенты на основе синтетических углей // *Украинский биохимический журнал*. – 1987. – Т. 59. – С. 100–106.
- Морфологические и биохимические аспекты биодеструкции полимеров. Под ред. Г. А. Пхакадзе // Киев.: Наукова думка. – 1986. – 152 с.

- Музыкант Л. И., Дудникова Г. Н. Современные данные о функциональной морфологии клеток грануляционной ткани в кожной ране // Архив патологии. – 1975. – № 5. – С. 80–87.
- Немец Е. А., Севастьянов В. И. Сравнительная эффективность применения гематологических методов для анализа прокоагулянтной активности медицинских материалов // Медицинская техника. – 1999. – № 6. – С. 18–22.
- Николаев В. Г. Гемоперфузия в эксперименте и клинике. Киев: Наукова Думка. – 1984.
- Ножевникова А. Н., Заварзин Г. А. К таксономии СО-окисляющих грамотрицательных бактерий. Изв. АН СССР сер. биол. – 1974. – Т. 3. – С. 436–440.
- Петраковская Э. А., Волова Т. Г., Иванов Ю. Н., Зеер Э. П. Исследование структурных и динамических особенностей твердого полиоксибутирата методами магнитного резонанса // Докл. РАН. – 1995. – Т. 344. – С. 270–273.
- Платэ Н. А. Полимеры для медицины // Наука в СССР. – 1986. – № 1. – С. 2–9.
- Платэ Н. А., Васильев В. Е. Физиологически активные полимеры // М.: Химия. – 1986. – 294 с.
- Полимеры медицинского назначения. Под ред. С. Манабу // М.: Медицина. – 1981. – 248 с.
- Производство белка на водороде. (Под ред. И. И. Гительсона). Новосибирск: Наука. – 1980. – 150 с.
- Применение плазменного напыления в производстве имплантатов для стоматологии. Под ред. Лясникова В. Н. Саратов: Саратов. гос. ун-т. – 1993.
- Пшежецкий С. Я., Котов Ф. Г., Милинчук В. К., Рогинский В. А., Тупиков В. И. ЭПР свободных радикалов // М.: Химия. – 1972. – 480 с.
- Пузырь А. П., Букаемский А. А., Белобров П. И., Волова Т. Г. Равномерное распределение и стабилизация наночастиц в полимерном геле полиоксибутирата. – Доклады РАН. – 2001. – Т. 376, № 4, – С. 547–549.
- Пхакадзе Г. А., Яценко В. П., Коломийцев А. К., Григорьева М. В., Коноплицкая К. Л. Биодеструктивные полимеры // Киев.: Наукова думка. – 1990. – 143 с.
- Розанова И. Б. Биодеструкция имплантатов // В кн. Биосовместимость. Под ред В. И. Севастьянова. – 1999. – С. 212–242.
- Розанова И. Б., Васин С. Л. Кальцификация имплантатов // в кн. Биосовместимость. Под ред В. И. Севастьянова. – 1999. – С. 246–294.
- Романов В. И. Физиологическая роль и метаболизм поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты у микроорганизмов // Успехи биол. химии. М.: Наука. – 1977. – № 18. – С. 211–230.

- Романов В. И., Юшкова Л. А., Кретович В. Л. (Связь между содержанием поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты в бактериоидах *Rhizobium lupini*, их дыханием и азотфиксацией // Докл. РАН. – 1974. – Т. 216. – С. 694–697.
- Романова А. К. Регуляция автотрофной ассимиляции углекислоты при фотосинтезе и хемосинтезе // Успехи микробиологии. М.: Наука. – 1975. – № 10. – С. 27–53.
- Савельева Н. Д., Жилина Т. Н. К систематике водородных бактерий // Микробиология. – 1968. – Т. 309, № 1. – С. 223–226.
- Савельева Н. Д., Заварзин Г. А., Веденина И. Я. Водородные бактерии // Успехи микробиологии. М.: Наука. – 1971. – № 7. – С. 121–155.
- Савенкова Л. Ф., Загреба Е. Д., Ваганас Ю. Я. Микроорганизмы как продуценты полиэфира D(-)- $\beta$ -оксимасляной кислоты // В кн.: Биосинтез вторичных метаболитов. Пушино. – 1987. – С. 52.
- Савенкова Л. Ф., Тупурейна В. В., Дзене А. В., Гончарова Н. Е. Получение и физико-химическая характеристика полимера  $\beta$ -оксимасляной кислоты из биомассы штамма *Azotobacter* 83 // В кн.: Тез. конференции Биоконверсия–83. Рига. – 1988. – С. 94.
- Савенкова Л. Ф., Загреба Е. Д., Герцберг З. В., Озолинь Р. К. Микробиологическое получение поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты // В кн. Микробная конверсия. Рига. – 1990. – С. 130–138.
- Санжиева Э. У., Заварзин Г. А. Бактерии, окисляющие окись углерода // Докл. РАН. – 1971. – Т. 196. – С. 956–959.
- Сакураи Я., Акаикэ Т. Взаимодействие полимеров медицинского назначения с живым организмом. Введение в биоматериаловедение. В кн. Полимеры медицинского назначения. Под ред. С. Манabu // М.: Медицина. – 1981. – С. 194–243.
- Сапин М. П. Иммунные структуры пищеварительной системы // М.: Медицина, – 1987. – 213 с.
- Севастьянов В. И. Биоматериалы для искусственных органов. В кн.: Искусственные органы. Под ред. В. И. Шумакова // М.: Медицина. – 1990. – С. 214–220.
- Севастьянов В. И. Биосовместимые материалы медицинского назначения // Перспективные материалы. – 1995. – № 5. – С. 41–55.
- Севастьянов В. И. Новое поколение материалов медицинского назначения // Перспективные материалы. – 1997. – № 4. – С. 41–55.
- Севастьянов В. И., Беломестная З. М., Дубович Т. И., Петров М. В. О предварительной оценке тромборезистентности полимерных материалов // Высокомолекулярные соединения. – 1981. – Т. 23А. – С. 1864–1867.
- Севастьянов В. И., Розанова И. Б., Цейтлина Е. А., Хазен Л. З., Горшов А. В., Корниенко Г. Н., Эберхарт Р., МакМиллен К. Методология отбора гемосовместимых материалов в условиях *in vitro* для искусственных органов // Медицинская техника. – 1990. – № 4. – С. 26–29.



- Севастьянов В. И., Немец Е. А. Пути повышения гемосовместимости биомедицинских изделий. В кн. Биосовместимость. Под ред В. И. Севастьянова // М.: ИЦ ВНИИгеосистем. – 1999. – С. 295–352.
- Севастьянов В. И., Васин С. Л., Перова Н. В. Методы исследования биоматериалов и медицинских изделий. В кн. Биосовместимость. Под ред. В. И. Севастьянова // М.: ИЦ ВНИИгеосистем. – 1999. – С. 47–87.
- Севастьянов В. И., Лаксина О. В., Новикова С. П. и др. Современные гемосовместимые материалы для сердечно-сосудистой хирургии. Под ред. В. И. Шумакова. // М.:ВНИИМИ. Медицина и здравоохранение, серия хирургия. – 1987. – выпуск 2.
- Севастьянов В. И., Перова Н. В., Довжик И. А, Титушкин И. А., Немец Е. А, Беломестная З. М., Шишацкая Е. И., Волова Т. Г. Медико-биологические свойства полиокси-алканоатов – биodeградируемых бактериальных полимеров // Перспективные материалы – 2001 – №.5. – С. 47–55.
- Седунов А. А. Ситалл – перспективный конструкционный материал для изготовления протезов // Стоматология – 1988. – № 5. – С.23–26.
- Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань // М.: Медицина. – 1981. – 310 с.
- Воспаление. (Руководство для врачей). Под. ред В. В. Серова и В. С. Паукова // М.: Медицина. – 1995. – 640 с.
- Слабова О. И., Никитин Д. И., Загреба Е. Д. Использование поли-β-оксимасляной кислоты в процессе окисления газовых субстратов и их смесей клетками *Methylobacterium organophilum* // Микробиология. – 1990. – Т. 59. – С. 938–940.
- Слоним И. Я., Любимов Ф. М. ЯМР в полимерах // М.: Химия. – 1966. – 186 с.
- Ставер А. М., Губарева Н. В., Лямкин А. И., Петров Е. А. // Физика горения и взрыва. 1984. – Т. 20, № 3. – С. 79–82.
- Стасишина Г. Н., Волова Т. Г. Штамм бактерий *Alcaligenes eutrophus* – продуцент // Патент РФ № 2053292 (приоритет от 08.01.1992). – БИ – 1966. – № 1.
- Тандзава Х. Полимеры, совместимые с живым организмом // В кн. Полимеры медицинского назначения, – 1981. – С. 87.
- Титушкин И. А., Васин С. Л., Алехин А. П., Розанова И. Б., Исаев В. И., Севастьянов В. И. Влияние структурных и энергетических свойств углеродных покрытий на адгезию тромбоцитов человека // Перспективные материалы. – 1999. – № 5. – С. 43 – 51.
- Трансплантология. Под ред. В. И. Шумакова // М.: Медицина. – 1995.
- Фалалеев О. В., Волова Т. Г., Васильев А. Д., Зеер Э. П., Петраковская Э. А. Исследование молекулярной структуры и физико-химических свойств свойств полиоксибутирата // ДАН. – 1994. – Т. 337. – С. 813–817.

- Фомин В. А., Гузеев В. В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. – 2001. – № 2. – С. 42–46.
- Фрешни З. Культура животных клеток // М.: Мир. – 1989. – 322 с.
- Хемосинтез в непрерывной культуре (Под ред И. А. Терскова). Новосибирск:Наука. – 1978. – 112 с.
- Чапут К., Яхиа Х., Ландри Д., Ривард Ч.–Х., Селмани А. Полигидроксибутират бактериального происхождения как поверхность для культивирования фибробластов связок позвоночника пациента // Биосовместимость. – 1995а. – Т. 3. – С. 21–30.
- Чапут К., Ассад М., Яхиа Х., Ривард Ч.–Х., Селмани А. Оценка цитотоксичности и гемолитической активности бактериальных сополимеров на основе полигидроксибутирата в условиях *in vitro* // Биосовместимость. – 1995б. – Т. 3. – С. 31–42.
- Шефтель В. О. Полимерные материалы. Токсические свойства: Справочник // Л.: Химия. – 1982. – 239 с.
- Шехтер А. Б., Серов В. В. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Архив патологии. – 1991. – № 7. – С. 7–14.
- Шехтер А. Б., Серов В. В. Воспаление и регенерация // В кн. Воспаление. – М.: Медицина. – 1995. – С. 200–219.
- Шехтер А. Б., Розанова И. Б. Тканевая реакция на имплантат // В кн. Биосовместимость. Под. ред В. И. Севастьянова // 1999. – С. 174–211.
- Шишацкая Е. И., Еремеев А. В., Гительзон И. И., Сетков Н. А., Волова Т. Г. Исследование цитотоксичности полиоксиалканоатов в культуре животных клеток // Доклады РАН. – 2000. – Т. 374, №.4. – С. 561–564.
- Шишацкая Е. И., Еремеев А. В., Гительзон И. И. Исследование свойств биodeградируемых полимеров (полиоксиалканоатов) в культуре животных клеток // Перспективные материалы. – 2001. – № 3. – С. 40–47.
- Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Гительзон И. И. Исследование токсикологических свойств полиоксиалканоатов в хроническом эксперименте *in vivo* // Докл. РАН. – 2002а. – Т. 383, № 4. – С. 565–567.
- Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Попова Т. Г. Исследование токсикологических свойств полиоксиалканоатов в хроническом эксперименте *in vivo* // Медицинская техника. – 2002б. – № 4. – С. 29–33.
- Шишацкая Е. И., Есимбекова Е. Н., Волова Т. Г., Калачева Г. С., Кратасюк В. А. Гигиеническая оценка полиоксиалканоатов – природных полиэфиров нового поколения // Гигиена и санитария. – 2002в. – № 4. – С. 59–63.
- Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Ефремов С. Н., Пузырь А. П., Могильная О. А., Гительзон И. И. Реакция тканей на имплантацию биодеструк-

тивных шовных нитей на основе полиоксибутирата // Докл. РАН. – 2002г. – Т. 383. – С. 838–842.

Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Ефремов С. Н., Пузырь А. П., Могильная О. А. Реакция тканей на имплантацию биодеструктивных шовных нитей на основе полиоксиалканоатов // Медицинская техника. – 2002д. – № 4. – С. 23–29.

Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Гительзон И. И. Об участии макрофагов и реакции фосфомоноэстераз в ответе тканей на имплантацию полиоксиалканоатов // Докл. РАН. – 2002е. – Т. 383. – С. 702–705.

Шишацкая Е. И., Волова Т. Г., Пузырь А. П., Гордеев С. А. Биodeградация полиоксиалканоатов в биологических средах // Перспективные материалы. – 2002ж. – №.2. – С. 57–62.

Шишацкая Е. И. Медико-биологические свойства биodeградируемых бактериальных полимеров полиоксиалканоатов для искусственных органов и клеточной трансплантологии // Автореферат диссертации на соискание степени канд. мед. наук. – Москва. – НИИиО МЗ РФ. – 2003. – 23 с.

Щипко М. Л., Кузнецов Б. Н., Волова Т. Г., Рудковский А. В. Разработка процесса газификации бурого угля с целью получения синтез-газа для биосинтеза полиоксиалканоатов // Химия твердого топлива. – 2003. – № 6 (в печати).

Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Скалецкий Н. Н., Игнатенко С. Н., Шальнев Б. И., Галибин О. В. Трансплантация островковый клеток поджелудочной железы. М.: Канон. – 1995.

Эме Ф. Диэлектрические измерения // М.: Химия. – 1967. – 223 с.

Яценко В. П., Кабак К. С., Терещенко Т. Л., Коломийцев А. К. // В кн. Морфологические и биохимические аспекты биодеструкции полимеров. Киев: Наукова думка. – 1986. – С. 73–89.

A Comprehensive Guide to Medical/Pharmaceutical Applications. (Szycher M, ed.), Technomic Press, Lancaster. – 1991.

Abe H. and Doi Y. Controlled release of lactet, an anticancer drug, from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres containing acylglycerols // Macromol. Reports. – 1992. – V. A29 (Suppl. 3). – P. 229–235.

Abe H. and Doi Y. Enzymatic and environmental degradation of racemic poly(3-hydroxybutyric acid)s with different stereoregularities // Macromol. – 1996. – V. 29. – P. 8683–8688.

Abe H. and Doi Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers: mini review // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 25, № 1–3. – P. 185–192.

Abe C., Taima Y., Nakamura Y., Doi Y. New bacterial copolyesters of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- $\omega$ -fluoroalkanoates by *Pseudomonas oleovorans* // Polym. Commun. – 1990. – V. 31. – P. 404–406.

- Abe H., Doi Y., Yamamoto Y. Controlled release of lastet, an anticancer drug, from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres containing acylglycerols // *Macromol. Rep.* – 1992a. – V. A29. – P. 229–235.
- Abe H., Yamamoto Y., Doi Y. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate) microspheres containing lastet and an anticancer drug and its application to drug delivery system // *Kobunshi Ronbun.* – 1992. – V. 49. – P. 61–67.
- Abe H., Marsubara I., Doi Y. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate] stereoisomers // *Macromol.* – 1995. – V. 28. – P. 844–853.
- Abe H., Doi Y., Hori Y., Hagiwara T. Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and (S,S)-lactet // *Polymer.* – 1997. – V. 39. – P. 59–67.
- Abe H., Doi Y., Satkowski M. M., Noda I. Miscibility and morphology of blends of isotactic poly(3-hydroxybutyrate) // *Macromol.* – 1994. – V. 27. – P. 50–54.
- Abe H., Matsubara I., Doi Y. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] stereoisomers // *Macromolecules.* – 1995. – V. 28. – P. 844–853.
- Abe H., Doi Y., Aoki H., Akehata T. Solid state structures and enzymatic degradability for melt-crystallized films of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric acid with different hydroxyalkanoic acids // *Macromol.* – 1998. – V. 31. – P. 1791–1797.
- Abe H., Kikkawa Y., Aoki H., Akehata T., Iwata T., Doi Y. Crystallization behavior and thermal properties of melt-crystallized poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] films // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1999. – V. 25. – P. 177–183.
- Abe H., Kikkawa Y., Iwata T., Aoki H., Akehata T., Doi Y. Microscopic visualization on crystalline morphologies of films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymer // *Polymer.* – 2000. – V. 41. – P. 867–874.
- Ackermann J.-U., Babel W. Growth associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – V. 47. – P. 144–149.
- Akhtar S., Pouton C. W., Notarianni L. J., Gould P. L. A study of the mechanism of drug release from solvent evaporated systems of biodegradable P(HB – HV) polyesters // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1989. – V. 41. – P. 5.
- Akhtar S., Pouton C. W., Notarianni L. J. The influence of crystalline morphology and copolymer composition of drug release from solution cast and melt – processed P(HB – HV) copolymers matrices // *J. Controlled Release.* – 1991. – V. 17. – P. 225–234.
- Akhtar S., Pouton C. W., Notarianni L. J. Crystallization behaviour and drug release from bacterial polyhydroxyalkanoates // *Polymer.* – 1992. – V. 33. – P. 117–126.

- Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. Properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) as a solution // *Macromol.* – 1976. – V. 9. – P. 774–780.
- Akiyama M., Taima Y., Doi Y. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacteria of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acid // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – V. 37. – P. 698–701.
- Alderete J. A., Karl D. W., Park C.–H. Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture // *Biotechnol. Prog.* – 1993. – V. 9. – P. 520–525.
- Alper R. and Lundgren D. G. Properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I. General considerations concerning the naturally occurring polymer // *Biopolymers.* – 1963. – V. 1. – P. 545–546.
- Alper M., Calvert P. D., Frankel R., Rieke P., Tirrell D. Materials synthesis based on biological processes // *Mat. Res. Soc.* – 1991. – V. 218. – P. 217–246.
- Amass W., Amass A., Tighe B. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies // *Polymer Int.* – 1998. – V. 47. – P. 89–144.
- An. Y., Dong. L., Li. L., Mo. Z., Feng Z. Isothermal crystallization kinetics and melting behavior of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)/poly(vinyl acetate) blends // *Europ. Polym. J.* – 1999. – V. 35. – P. 365–369.
- Anderson J. M. Inflammatory response to implantants // *ASAIO.* – 1988. – V. 11. – P. 101–106.
- Anderson J. M. Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices // *Cardiovasc. Pathol.* – 1993. – V. 2 (Suppl.). – P. 33S–41S.
- Anderson J. M. Biomaterials and medical implant science: Present and future perspectives: A summary report // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1996. – V. 32. – P. 143–147.
- Anderson A. J., Dawes E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates // *Microbiol. Rev.* – 1990. – V. 54. – P. 450–472.
- Anderson A. J., Williams D. R., Taidi B., Dawes E. A., Ewing D. F. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium axorquens* and *Alcaligenes eutrophus* // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 103. – P. 93–102.
- Ando. Y., Fukada. E. Piezoelectric properties and molecular motion of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) films // *J. Polym. Sci: Pol. Phys. Edition.* – 1994. – V. 22. – P. 1821–1834.
- Angelova N., Hukeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials // *Tibtech.* – 1999. – V. 17. – P. 409–421.

- Ashby R. D., Foglia T. A. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1998. – V. 49. – P. 431–437.
- Ashraf A. M., Gamal. S. S., Amany. H. H. II. Dielectric investigation of cold crystallization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) // *Polymer.* – 1999. – V. 40. – P. 5377–5391.
- Asrar J., Pierre J. R. Nucleating agents for polyhydroxyalkanoates and other thermoplastic polyesters and methods for their production and use // US Patent № 5 973 100.–1999.
- Asrar J., Pierre J. Poly(hydroxyalkanoates) compositions and method of their use in the production of films // European Patent № 0996670A1. – 2000a.
- Asrar J., D'Haene P. Polymer blends containing polyhydroxyalkanoates and compositions with good retention of elongation // US Patent № 6 191 203. – 2001a.
- Asrar J., D'Haene P. Modified polyhydroxyalkanoates for production of coatings and films // US Patent № 6 191 083. – 2001b.
- Asrar J., K. J. Gruys. Biodegradable Polymer (Biopol<sup>®</sup>) // In: Series of Biopolymers in 10 vol. ( A. Steinbüchel, ed.) Wiley – VCY Verlag GmbH. – 2002. – Vol. 4. – P. 55–86.
- Atkins T. W. Fabrication of microcapsules using poly(ethelene adipate) and a blend of poly(ethylene adipate) with poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate): incorporation and release of bovine serum albumin // *Biomaterials.* – 1997. – V. 18. – P. 173–180.
- Atkins T. W., Peacock S. J. The incorporation and release of bowine serum albumin from poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules // *J. Microincapsulation.* – 1996a. – V. 13. – P. 709–717.
- Avella M., Martuscelli E. Poly(D-(-)-(3-hydroxybutyrate)/polyethylenen oxide) blends: phase diagram, thermal and crystallization behavior // *Polymer.* – 1998. – V. 29. – P. 1731–1737.
- Avella M., Martuscelli E., Greco P. Crystallization behavior of poly(ethylenen oxide) from poly-D-(-)-(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylenen oxide): phase structuring, morphology and thermal behavior // *Polymer.* – 1991. – V. 32. – P. 1647–1653.
- Avelle M., Martuscelli E., Raimo M. Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers // *J. Materials Science.* – 2000 a. – V. 35. – P. 523–545.
- Avelle M., Rota G. A., Martuscelli E., Raimo M., Sadocco P., Elegin G., Riva R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites: thermal, mechanical properties and biodegradation behaviour // *J. Materials Science.* – 2000b. – V. 35. – P. 829–836.
- Baptist J. N. Processing for preparing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid // US Patent № 3 036 959. – 1962a.

- Baptist J. N. Processing for preparing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid // US Patent № 3 044 942. – 1962b.
- Baptist J. N. Molded product containing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and method of making // US Patent № 3 107 172. – 1963.
- Baptist J. N. Plasticized poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and process // US Patent № 3 182 036 – 1965.
- Baptist J. N., Ziegler J. B. Method of making absorbable surgical sutures from poly beta hydroxy acid // US Patent № 3 229 766. – 1965.
- Barham G. N., Sanders J. K. M. Observation of mobile poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) in the storage granules of *Methylobacterium* AMI by *in vivo*  $^{13}\text{C}$  – NMR spectroscopy // FEBS Lett. – 1984. – V. 231. – P. 16–18.
- Bear M. M., Leboucherdurand M. A., Langlois V., Lenz R. W., Goodwin S., Guerin P. Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side chains // React. Funct. Polymers. – 1999. – V. 34. – P. 65–77.
- Behrend D., Kaufmann T., Michalik I., Schmitz K. P. Effect of softening agents on biodegradation and biocompatibility of poly-beta-hydroxybutyric acid *in vivo* // Biomed. Tech. – 1998. – V. 43. – P. 430–431.
- Behrend D., Nishan C., Kunzer C., Sass M., Schmitz K.–P. Resorbable scaffold for tissue engineering. // Proc. European Medical and Biological Engineering Conference. / Med. Biol. Eng. Comput. – 1999. – V. 37 (Suppl.). – P. 1510–1511.
- Behrend D., Kramer S., Schmitz K. P. Biodegradation and biocompatibility of resorbable poluester // Zetl. Interok. Biomater // 2000. – P. 28–32.
- Bertrand J.–L., Ramsay B. A., Ramsay J. A., Chavarie C. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava* // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – V. 56. – P. 3133–3138.
- Beumer G. J., van Blitterswijk C. A., Ponec M. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an *in vivo* evaluation // Br. J. Addict Alcohol Other Drugs. – 1978. – V. 73, № 4. – P. 423–424.
- Billingham № C., Henman T. J., Holmes P. A. Degradation and stabilization of polyesters of biological and synthetic origin // In: Development in Polymer Degradation (N. Grassie Ed.). Amsterdam: Elsevier. – 1978. – V. 7. – P. 81–121.
- Bioartificial organs. I. (A. Procop, D. Hunkelen, and A. D. Cherrington, eds.) // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1997. –V. 831. – 476 p.
- Bioartificial organs. II. (D. Hunkelen, A. Procop, and A. D. Cherrington, eds.) // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1999. –V. 875. – 415 p.
- Bioartificial Organs III. Tissue sourcing, immunoisolation, and clinical trials. (D. Hunkeler, A. Cherrington, A. Prokop, R. Rajotte Eds.). Annals of The New York Academy of Sciences / N. Y.: – 2001. – V. 944.
- Biocompatibility polymers, metals, and composites. (N. Szycher Ed.), Technom. Publ. Co Inc., Lancaster. – 1983.

- Biomedical polymers. (S. W. Shalaby Ed.), Hanser/Gardner Publ., Inc., Cincinnati. – 1994.
- Bissery M. C., Puisieux F., Thies C. A study of process parameters in the making of microspheres by the solvent evaporation procedure // Third Exp. Cong. Int Technol. Pharm. – 1983. – V. 3. – P. 233–239.
- Bissery M. C., Valeriale F., Thies C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of CGNU-loaded microspheres prepared from polylactide and polyhydroxybutyrate // In: Microspheres and Drug Therapy. Pharmacocological, Immunological and Medical Aspects (S. S. Davis, L. Illum, J. G. McVie, E. Tomlinson, eds.). Amsterdam: Elsevier. – 1984a. – P. 217–227.
- Bissery M. C., Valeriate F., Thies C. *In vitro* lomustine release from small poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and poly(D, L-lactide) microspheres // Proc. Int. Symp. Controlled release Bioact. Mater. – 1984b. – V. II. – P. 25–26.
- Bissery M. C., Valeriate F., Thies C. Fate and effect of CGNU – loaded microspheres made of poly(D, L-lactide) and poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB) in mice // Proc. Int. Symp. Controlled release Bioact. Mater. – 1985. – V. 12. – P. 181–182.
- Biomedical polymers. Designed – to – degrade systems (Shalaby W. Shaloby, ed.). – Hanser Publishers, Minich Vienna. New York. – 1994. – 263 p.
- Biomedical polymers. S. W. Shalaby (ed.). Hanser // Gardner Publ. Inc. Cincinnati. – 1994.
- Bluhm T. L., Hamer G. K., Marchessault R. H., Fyfe C. A., Veregin R. P. Isodimorphism in bacterial Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) // Macromol. – 1986. – V. 19. – P. 2871–2876.
- Blümm E., Owen A. J. Miscibility, crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(L-lactide) blends // Polymer. – 1995. – V. 36. – P. 4077–4081.
- Boeree R., Dove J., Knowles J., Hastings G. Development of a degradable composite for orthopedic use: mechanical evaluation of a hydroxyapatite – polyhydroxybutyrate composite material // Biomaterials. – 1993. – V. 14. – P. 793–796.
- Bon throne K. M., Clauss J., Horowitz D. M., Hunter B. K., Sanders J. K. M. The biological and physical chemistry of poly-hydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy // FEMS Microbiol. – 1992. – V. 103. – P. 269–277.
- Borden M., Attawia M., Laurencin C. T. The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 61, № 3. – P. 421–429.
- Borkenhagen M., Stoll R. C., Suter U. W., Aebischer P. *In vivo* performance of a new biodegradable polyester system used as a nerve guidance channel // Biomaterials. – 1998. – V. 19, № 23. – P. 2155–2165.
- Borman E. J., Leibner M., Beer B. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 48. – P. 84–88.



- Boynton Z. L., Koon J. J., Brennan E. M., Clouart J. D., Horowitz D. M., Gerngross T. U., Huisman G. W. Reduction of Cell lysate viscosity during processing of poly(3-hydroxyalkanoates) by chromosomal integration of the staphylococcal nuclease gene in *Pseudomonas putida* // Appl. Microbiol. Biotechnol. –1999. – V. 65. – P. 1524–1529.
- Bourque D., Ouellette B., Andre G., Groleau D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens* // Appl. Microbiol. Biothechnol. –1992. – V. 37. – P. 7–12.
- Bourque D., Pomerleau Y., Groleau D. High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high molecular mass PHB // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – V. 44. – P. 367–376.
- Bowald S. F., Johansson E. G. A novel surgical material // European Patent Application № 0 349 505 A2. – 1990.
- Bovey F. High Resolution NMR of macromolecules. N Y.: Acad. Press. 1972. № 4. – P. 124.
- Brandl H., Gross R. A., Lenz R. W., Fuller C. W. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyesters // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54. – P. 1977–1982.
- Brandl H., Gross R., Lenz R., Fuller R. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(- $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 1990. – V. 41. – P. 77–93.
- Braunegg G., Lefebvre G., Genzer K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects (review article) // J. of Biotechnol. –1998. – V. 65. – P. 127–161.
- Brissova M., Lacik I., Powers A. C., Anilkumar A. C., Wang T. Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system // J. Biomed. Mater. Research. – 1998. – V. 39. – P. 61–70.
- Brophy M. R., Deasy P. *In vitro* and *in vivo* studies on biodegradable polyesters microparticles containing sulphamethizole // Int. J. Pharm. – 1986. – V. 29. – P. 223–231.
- Brucato C., Wong S. Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active // Arch. Biochem. Biophys. – 1991. – V. 290. – P. 497–502.
- Brückner S., Meille S. V., Malpezzi L., Cesaro A., Navarini L., Tomblini R. The structure of Poly(D-(-)- $\beta$ -polyhydroxybutyrate). A refinement based on the Rietveld method // Macromol. – 1988. – V. 21. – P. 967–972.
- Brune H., Niemann E. Use and compatibility of bacterial protein (*Hydrogenomonas*) with various contents of poly-beta-hydroxybutyric acid in animal nutrition. I. Weight development and N balance in growing rats // Z. Tierphysiol. Tiereüht. Bull. – 1977a. – V. 38. – P. 12–22.

- Brune H., Niemann E. Value and compatibility in animal nutrition of bacterial protein (*Hydrogenomonas*) containing various amount of poly-beta-hydroxybutyric acid 2. Body weight and nitrogen balance and fatty acid pattern of liver, muscle and kidney depot fat of growing swine // Z. Tierphysiol. Tiereüht. Bul. – 1977b. – V. 38. – P. 81–93.
- Burpee V. F., Hackenberg R. W., Hillegas D. V. Acid phosphatase activity as enzymatic assent of the polymer – tissue compatibility // J. Biomed. Mater. Res. – 1978. – V. 12, № 5. – P. 767–771.
- Byron D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics // Trends Biotechnol. – 1987. – V. 5. – P. 246–250.
- Byron D.(ed.) Biomaterials: novel materials from biological sources // Stockton, New York. – 1989.
- Byron D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: polyhydroxyvalerate copolymers // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 103. – P. 247–250.
- Byron D. Polyhydroxyalkanoates // In: D. P. Mobley, ed. Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors. Hanser Munich. – 1994. – P. 5–33.
- Cammas S., Bear M. M., Moine L., Escalup R., Ponchel G., Kataoka K., Guerin Ph. Polymers of malic and 3-alkylmalic acid as synthetic PHA in the design of biocompatible hydrolysable devices // Int. J. of Biol. Macromol. – 1999. – V. 25, № 1–3. – P. 273–282.
- Cao A., Arai Y., Yoshie №, Kasuya K.–I., Doi Y., Inoue Y. Solid structure and biodegradation of the compositionally fractionated poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acids) // Polymer. – 1999. – V. 40. – P. 6821–6830.
- Canetti M., Urso M., Sadocco P. Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) // Polymer. – 1999. – V. 40. – P. 2587–2594.
- Catcheside D. E. A., Ralph J. P. Biological processing of coal // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 16–24.
- Cevallos, M. A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 1646–1654.
- Chaput C., Des Rosiers E. A., Assad M., Brochu M., Yahia L., Selmani A., Rivard C. Processing biodegradable natural polyesters for porous soft materials // NATO ASI Ser. – 1995a. – V. 294. – P. 229–245.
- Chaput C., Yahia L., Selmani A., Rivard C., Mater C. Natural Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) polymers as degradable biomaterials // Res. Soc. Symp. Proc. – 1995b. – V. 394. – P. 111–116.
- Chen C., Chen S. C. // US Patent № 5 116 868.–1992.
- Chen Y., Yang G., Chen Q. Solid state NMR study on the structure and mobility of the noncrystalline region of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-

- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) // *Polymer*. – 2002. – V. 43. – P. 2095–2099.
- Chen G.–O., Page W. J. The effect of substrate on the molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* // *UWD. Biotechnol. Lett.* – 1994. – V. 16. – P. 155–160.
- Chen G.–Q., Konig K. H., Lafferty R. M. Production of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate and poly-D(-)-3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus* // *Antonie van Leeuwenhoek*. –1991. – V. 60. – P. 61–66.
- Chen G. Q., Zang G., Park S. J., Lee S. Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // *App. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 57. – P. 55–55.
- Cheung A. K., Lemke H. Criteria and standartization for biocompatibility // *Nephrol. Dial. Transplant.* –1994. – № 1. – P. 72–76.
- Chiu H.–C., Kopeckova P., Deshmane S. S., Kopecek J. Lysosomal degradability of poly(amino acids) // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1997. – V. 34. – P. 381–392.
- Choi J., Lee S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation // *Bioprocess Eng.* – 1997. – V. 17. – P. 335–342.
- Choi J., Lee S. Y. Efficient and economical recovery of poly-(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals // *Biotechnol. Bioeng* –1999. – V. 62. – P. 546–553.
- Choi J., Lee S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1999. – V. 51. – P. 13–21.
- Chowdhury B., John M. E. Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate // *Thermochim. Acta.* – 1998. – V. 313. – P. 43–53.
- Chun Y. S., Kim W. N. Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly( $\beta$ -caprolactone) blends // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V. 51. – P. 124–132.
- Chun Y. S., Kim W. N. Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends. – *Polymer*. – 2000. – V. 41. – P. 2305–2308.
- Ciardelli G., Saad B., Hirt T., Keiser O., Neuenschwander P., Suter W. U., Uhlschmid G. K., Mater J. Phagocytosis and biodegradation of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] particles in macrophage cell line // *Sci. Mater. Med.* – 1995. – V. 6. – P. 725–730.
- Clark D. P., Cronan J. Two-carbon compounds and fatty acid as carbon sources // In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin K. B. et al, eds.) *E. coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, D. C. – 1996. – V. 1. – P. 343–357.

- Collins S. H. Choice of substrate in polyhydroxybutyrate synthesis. *Carbon Substrates in Biotechnology*. – 1987. – V. 21. – P. 161–169.
- Collins A. E. M., Deasy P. H., MacCarthy D., Shanley D. H. Evaluation of a controlled release compact containing tetracycline hydrochloride bonded to looth for the treatment of periodontal disease // *Int J. Pharm.* – 1989. – V. 51. – P. 103–114.
- Consensus conference of biocompatibility. // In:(H. Klinkmann, A. M. Davison Eds). *Nephrol. Dial. Transplant. Oxford, Oxford University*. – 1994. – V. 9 (Suppl.). – P. 32–40.
- Conte U., La Manna A., Tessitore G. // US Patent № 278 517.
- Conway B. R., Eyles J. E., Alpar H. O. Immune response to antigen in microspheres of different polymers // *Proc. Int. Symp. Controlled release Bioact. Mater.* – 1996. – V. 23. – P. 335–336.
- Conway B. R., Eyles J. E., Alpar H. O. A comparative study on the immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres // *J. Controlled release*. – 1997. – V. 49. – P. 1–9.
- Cox M. K. Properties and applications of polyhydroxyalkanoates // In: *Biodegradable Plastics and Polymers*.(Y. Doi and K. Fukuda, eds.). Amsterdam:Elsevier. – 1994. – P. 120–135.
- Cromwick A.–M., Foglia T., Lenz R. V. The microbial production of poly–(hydroxyalkanoates) from tallow // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1996. – V. 46. – P. 464–469.
- Cornibert J., Marchessault R. H. Physical properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. IV. Conformational analys and crystalline structure // *J. Mol. Biol.* – 1972. – V. 71. – P. 735–756.
- Dang M. – H., Birchler F., Ruffieux K., Wintermantel E. Toxicity screening of biodegradable polymers I. Section and evaluation of cell culture test methods // *J. Environ. Poly. Degrad.* – 1996. – V. 4. – P. 197–203.
- Daniel M., Choi J. H., Kim J. H., Lebeault J. M. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – V. 37. – P. 702–706.
- Danielsen C. Ch. Mechanical properties of native and reconstituted tail tendon collagen upon maturation // *Mech. Ageing and develop.* – 1987. – V. 40, № 1. – P. 9–16.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. Cell walls in plants are constructed of multiple layers of cellulose // In: *Molecular cell biology* (Scientific American Book). Washington, DC.: – 1986. – Chapter 5. – P. 179–187.
- Davies M. C., Short R. D., Khan M. A., Watts J. F., Brown A., Eccles A. J., Humphrey P., Vickerman J. C., Vert M. A. A XPS and SSIMS analysis of biodegradable biomedical polyesters // *Surface & Inter. Analysis.* – 1989. – V. 14. – P. 115–120.

- Davies S., Tighe B. Cell attachment to gel-spun polyhydroxybutyrate fibers // Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.) – 1995. – V. 36. – P. 103–104.
- Dawes E. A., Senior P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in Microorganisms // Adv. Microbiol. Physiol. – 1973. – V. 10. – P. 10135–10266.
- Dawes E. A (Ed.) Novel biodegradable microbial polymers // Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands. – 1990. – 287 p.
- D'Haene P., Remse E. E., Asras J. Preparation and characterization of a branched bacterial polyester // Macromol. – 1999. – V. 32. – P. 5229–5235.
- De Micheli C., Navarini F., Roncoroni V. Process for the manufacture of totally biodecomposable films with high mechanical characteristics and relevant products and applications // European Patent № 736563. – 1996.
- Dean W., Morgenthaleer J., Fowkes S. W. GHB: the natural mood enhancer // USA: Smat. – 1998.
- Deasy S., Tighe B. Cell attachment to gel-spun polyhydroxybutyrate fibers // Poly. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym., Chem.) – 1989. – V. 36. – P. 103–104.
- Degradable materials. (Barenberg S., Brash J., Narayan R., Redpath A, eds.), CRC Press, Boca Raton. – 1990.
- De Smet M. J., Egink G., Witholt B., Kingma J., Wynberg H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane // J. Bacteriol. – 1983. – V. 154. – P. 870–878.
- Doi Y. // US Patent 230 461
- Doi Y. Microbial polyesters // VCH Publishers :New-York. – 1990.
- Doi Y. Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. –1995.
- Doi Y., Abe H. Structural effects on biodegradation of aliphatic polyesters // Macromol. Symp. – 1997. – V. 118. – P. 725–731.
- Doi Y., Kunioka M., Naksmura Ya., Soga K. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis of poly(β-hydroxybutyrate) isolated from *Bacillus megaterium* // Macromolecules. 1986a. – V. 19. – P. 1274–1279.
- Doi Y., Kunioka M., Naksmura Ya., Soga K. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β-hydroxybutyrate) and copolyester of β-hydroxybutyrate and β-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 // Macromolecules. – 1986b. – V. 19. – P. 2860–2862.
- Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 28. – P. 330–334.

- Doi Y., Kanesawa Y., Nakamura Y., Kunioka M. Nuclear magnetic resonance studies of Poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989a. – V. 55. – P. 2932–2938.
- Doi Y., Kanesawa Y., Tanahashi N., Kumagai Y. Biodegradation of microbial poly(hydroxyalkanoates) // Makromol. Chem. Rapid. Commun. – 1989b. – V. 10. – P. 227 – 230.
- Doi Y., Segawa A., Kawaguchi Y., Kunioka M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus* // FEMS Microbiol. Lett. – 1990. – V. 67. – P. 165–170.
- Doi Y., Kanesawa Y., Kawaguchi Y., Kunioka M. Hydrolytic degradation of microbial polyesters in the marine environment // Polym. Degrad. Stub. – 1992a. – V. 36. – P. 173–177.
- Doi Y., Kawaguchi Y., Nakamura S., Hiramitsu M., Yoshida Y., Kimura H. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates // FEMS Microbiol. Rev. – 1992b. – V. 1–3. – P. 103–108.
- Doi Y., Mukai K., Kasuya K., Yamada K. Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates. // In: (Y. Doi and K. Fukuda K, eds). Biodegradable plastics and polymers. Elsevier, Amsterdam. – 1994. – P. 39–51.
- Doi Y., Kitamura S., Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) // Macromol. – 1995. – V. 28. – P. 4822–4828.
- Doi Y., Abe H., Shimamura E., Hiramitsu M., Nakamura S. Microbial polyhydroxyalkanoates {Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate]} // In: J. C. Salomone, ed. Polymeric materials encyclopedia. Boca Raton. FL: CRC Press. – 1996. – V. 6. – P. 4304–4309.
- Doyle C., Tanner E. T., Bonfield W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate reinforced with hydroxyapatite // Biomaterials. – 1990. – V. 11. – N.3. – P. 206–215.
- Doyle C., Tanner E. T., Bonfield W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate reinforced with hydroxyapatite // Biomaterials. – 1991. – V. 12, № 2. – P. 841–847.
- Drury J. K., Ashton T. R., Cunningham J. D., Maini R., Pollock J. G. Experimental and clinical experience with a gelatin impregnated Dacron prosthesis // Ann. Vasc. Surg. – 1987. – V. 1. – P. 542–547.
- Du G., Chen J., Yu J., Lun Sh. Continuous production of poly-3hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system // 2001 – V. 88. – P. 59–65.
- Duarte M. G., Brunnel D., Gil M. H., Schacht E. Microcapsules prepared from starch derivatives // J. Mater. Sci: Mater. In Medicine. –1997. – V. 8. – P. 321–323.

- Duvernoy O., Malm T., Ramstrom J., Bowald S. A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery: 6- and 24-month evaluation with CT // *Thorac Cardiovasc. Surg.* – 1995. – V. 43, № 5. – P. 271–274.
- Engelberg I., Kohn J. Physico-chemical properties of degradable polymers used in medical application: a comparative study // *Biomaterials.* – 1991. – V. 12. – P. 292–304.
- Entholzner E., Mielke I., Picilmeier R., Weber F., Schneck H. EEG changes during sedation with gamma-hydroxybutyric acid // *Anesthetist.* – 1995. – V. 44. – P. 345–350.
- Eldridge J. H., Hammond C. J., Meulhrock J. A., Stass J. K., Gilbey R. M., Tice T. R. Controlled vaccine release in the gubassassociated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the patches // *J. Controlled. release.* – 1990. – V. 11. – P. 209–214.
- Ellar D., Lundgren D., Okamura G. K., Marchessult R. H. Morphology of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules // *J. Mol. Biol.* – 1973. – V. 35. – P. 489–502.
- Embelton J. K., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. IX: Microincapsulation studies: effects of polymers composition and process parameters on polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsule morphology // *Biomaterials.* – 1992. – V. 9, № 1. – P. 73–87.
- Embelton J. K., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. X: Microincapsulation studies: control of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsule porosity via polycaprolactone blending // *Biomaterials.* – 1993. – V. 10, № 3. – P. 341–352.
- Etzrodt D., Rybka C., Michalik I., Behrend D., Schmitz K. P. Effect of molecular weight and protein coating on surface properties of poly(beta-hydroxybutyric acid) and effect on polymer-cell interaction // *Biomed. Tech.* – 1997. – V. 42. – P. 445–446.
- Galaev I. Y., Mattiasson B. «Smart» polymers and what they could do in biotechnology and medicine // *Tib. Tech.* – 1999. – V. 17. – P. 335–340.
- Galego N., Miguens F. C., Sanchez R. Physical and functional characterization of PHA<sub>SCL</sub> membranes // *Polymer.* – 2002. – V. 43. – P. 3109–3114.
- Galgut P., Pitrola R., Waite I., Doyle C., Smith R. Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed in rat // *J. Clin. Periodontal.* – 1991. – V. 18. – P. 581–586.
- Galletti P., Jauregui H. O. Liver support systems. In: Bronzino J. (ed.). *The biomedical engineering handbook.* Boca Raton. FL: CRC Press. – 1995. – P. 952–966.
- Gangrade N., Price J. C. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties // *J. Microencapsulation.* – 1991. – V. 8. – P. 185–202.
- Gangrade N., Price J. C. Properties of implantable pellets prepared from a biodegradable polyesters // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* – 1992. – V. 8. – P. 185–202.

- Ganta S. R., Piesco N. P., Long P., Gassner R., Motta L. F., Papworth G. D., Stolz D. B., Watkins S. C., Agarwal S. Vascularization and tissue infiltration of a biodegradable polyurethane matrix // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – V. 64A, № 2. – P. 242–248.
- Garrido L. Nondestructive evaluation of biodegradable porous materials for tissue engineering // In: *Methods in Molecular Medicine: Tissue Engineering Methods and Protocols* (Morgan J. R., Yarmushi M. E, eds.), Totowa N: Humana Press. – 1999 – V. 8. – P.35–45.
- Gassner F., Owen A. J. Physical properties of Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) – Poly( $\beta$ -caprolactone) blends // *Polymer.* – 1994. – V. 35. – P. 2233–2236.
- Genser K. F., Renner G., Schwab H. Molecular cloning, sequencing and expression in *E. coli* BL21 (DE3) of the poly(3-hydroxyalkanoate) – synthesis genes from of *Alcaligenes latus* DSM 1124 // *J. Biotechnol.* – 1998. – V. 64. – P. 123–135.
- Gerngross T. U., Martin D. P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 6279–6283.
- Gerlach J. C. Development of a hybrid liver support system // *A Review. Int. J. Artif. Organs.* – 1996. – V. 19. – P. 645–654.
- Gessa G. L., Fadda F., Mormile di Campochiro // US Patent № 361 490.
- Gessa G. L., Vargiu L., Crabai F., Boero G. C., Caboni F., Camba R. Selective increase of brain dopamine induced by gamma-hydroxybutyrate // *Life Sci.* – 1966. – V. 5. – P. 1921–1930.
- Gotfredsen K., Nimb L., Hjorting-Hansen E. Immediate implant placement using a biodegradable barrier polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin. An experimental study in dogs // *Clin. Oral. Res.* – 1994. – V. 5. – P. 83–91.
- Gogolewski S., Javanovic M., Perren S. M., Hughes M. K. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/PHV) // *Biomaterials.* – 1990. – V. 11. – P. 679–685.
- Gogolewski S., Javanovic M., Perren S. M. The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates // *Degradation and Stability.* – 1993a. – V. 40. – P. 313–322.
- Gogolewski S., Javanovic M., Perren S. M., Dillon J. G., Hughes M. K. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerates (PHB/PHV) // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1993b. – V. 27. – P. 1135–1148.
- Goh S. H., Ni X. A completely miscible ternary blend system poly(3-hydroxybutyrate) poly(ethylene oxide) and polyepichlorohydrin // *Polymer.* – 1999. – V. 40. – P. 5733–5735.



- Gould P. L., Holland S. J., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. IV. Hydroxybutyrate – valerate copolymers as nondisintegrating matrices for controlled release oral dosage forms // *Int. J. Pharm.* – 1987. – V. 38. – P. 231–237.
- Gonzalez O., Smith R. L., Goodman S. B., Effect of size, concentration, surface area and volume of polymethylmethacrylate particle on human macrophages *in vitro* // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1996. – V. 30. – P. 463–475.
- Gordeev S. A., Nekrasov Y. P. Processing and mechanical properties of oriented poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) fibers // *J. Mater. Sci. Lett.* – 1999. – V. 18. – P. 1691–1692
- Gordeev S. A., Nekrasov Y. P., Shilton S. J. Processing of gel-spun poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) fibers // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2001. – V. 81. – P. 2260–2264.
- Grassie N., Murray E. J. The thermal degradation of poly(-D)- $\beta$ -hydroxybutyric acid: Part I – Identification and quantitative analysis of products // *Polym Degrad. And Stability.* – 1984. – V. 6. – P. 47–61.
- Grenn Ph. R., Kemper J., Schechtman L., Guo L., Satkowski M., Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm H. A. Formation of short chain/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* // *Biomacromol.* – 2002. – V. 3. – P. 208–213.
- Gregor H. P. Biomedical applications of polymers // Plenum Press. – N.Y. – 1975.
- Gref R., Minamitake Y., Peraacchia M. T., Trubatskoy V., Torchilin V., Langer R. Biodegradable long-circulating nanospheres // *Science.* – 1994. – V. 263, № 5153. – P. 1600–1603.
- Griebel R., Smith Z., Merrick J. M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium* // *Biochemistry.* – 1968. – V. 7. – P. 3676–3681.
- Grobe-Uhlmann R., Bley T. A modular approach to situation identification of the dynamics of bacterial populations synthesising poly- $\beta$ -hydroxybutyrate // *Bioprocess Engineering.* – 199. – V. 21. – P. 191–200.
- Gross R. A. Bacterial polyesters: structural variability in microbial synthesis. In: *Biomedical polymers.* Shalaby Sh. W. (ed.). Hanser, N.Y. – 1994. – P. 173–188.
- Gürsel I., Hasirci V. Properties and drug release behaviour of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) copolymer microcapsules // *J. Microincapsulation.* – 1995. – V. 12. – P. 185–193.
- Gürsel I., Balcik C., Arica Y., Akkus O., Akkas N., Hasirci V. Synthesis and mechanical properties of interpenetrating network of polyhydroxybutyrate – cohydroxyvalerate and polyhydroxyethyl methacrylate // *Biomaterials.* – 1998. – V. 19. – P. 1137–1143.

- Gürsel I., Korkusuz F., Türesin F., Alaeddinoğlu N. G., Hasirci V. *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis // *Biomaterials*. – 2000. – V. 22, № 1. – P. 73–80.
- Hahn J., Eschenlauer A. C., Narrol M. N., Somers D. A., Srien F. Growth kinetics nutrient uptake, and expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) synthesis pathway in transgenic maize cell suspension cultures // *Biotechnol. Prog.* – 1997. – V. 13. – P. 347–354.
- Hall B., Baldwin J., Rhie H. G., Denni D. *Nocardia corallina* polyhydroxyalkanoate synthase // GenBank accession no. AF019964. – 1998.
- Hamada T. Biodegradable fiber nets for growing seaweed with long life // Japanese Patent № 09000096. – 1997.
- Hammond T., Liggat J. J., Montador J. H., Webb A. Plasticizers for biodegradable polyesters, especially polyhydroxyalkanoate // US Patent № WO 94/28061. – 1994.
- Handbook of bioactive ceramics, bioactive glasses and glass – Ceramics, CRC Press, Boca Raton, Florida. – 1990. – V. I.
- Hangii U. J. Pilot scale production of PHB with *Alcaligenes latus* // In: E. A. Dawes Ed). Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer academic, Dordrecht, the Netherlands. – 1999. – P. 22–26.
- Hao J., Deng X. Semi-interpenetrating networks of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with net-poly(ethylene glycol) // *Polymer*. – 2001. – V. 42. – P. 4091–4091.
- Hant J. A., Flanagan B. F., McLaughlin P. J., Strickland I., Williams D. F. Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: Evaluation of cellular infiltration and TNF $\alpha$  production // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1996 – V. 31. – P. 139–145.
- Harrison S. T., Chase H. A., Amor S. R., Bontherone K. M., Sanders J. K. Plasticization of poly (hydroxybutyrate) *in vivo* // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1994. – V. 28. – № 5. – P. 545–552.
- Hasircii V. Biodegradable biomedical polymers // In: *Biomaterials and Bioengineering Handbook* (Wase D. L, ed). New-York: Marcel Dekker. – 2000a. – P. 141–155.
- Hasircii V., Gürsel I., Türesin F., Yiggited G., Korkusuz F., Alaeddinoglu G. Microbial polyhydroxyalkanoates as biodegradable drug release materials // In: *Biomedical science and technology* (A. A. Hincal and H. S. Kas, eds.) New-York: Plenum Press. – 1998. – P. 183–187.
- Hassan M. A., Shrai Y., Kusabuashi №, Karim M., Nakanishi K., Hashimoto K. The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically treated palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides* // *J. Ferment. Bioeng.* – 1997. – V. 83. – P. 485–488.

- Haywood G. W., Anderson A. J., Dawes E. A. The importance of PHB synthase substrate specificity in polyhydroxyalcanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus* // FEMS Microbiol. Lett. – 1989. – V. 57. – P. 1–6.
- Hazari A., Johanson–Ruden G., Junemo–Bostron K., Ljungberg C., Terenghi G., Green C., Wiberg M. A new resorbable wraparound implant as an alternative nerve repair technique // J. Hand. Surg. – 1999a. – V. 24B. – P. 291–295.
- Hazari A., Wiberg M., Johansson–Ruden G., Green C., Terenghi G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair // Br. J. Plast. Surg. – 1999b. – V. 52, № 8. – P. 653–657.
- Hazenberg W., Witholt B. Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – V. 48. – P. 588–596.
- Heath C. A. Cells for tissue engineering // Tib. Tech. – 2000. – V. 18, № 1. – P. 17–19.
- Hein S., Sohling B., Gottschalk G., Steinbüchel A. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *E. coli* // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V. – 153. – P. 411–418.
- Hein S., Tran H., Steinbüchel A. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalcanoic acid synthase similar to that anoxygenic purple sulfur bacteria // Arch. Microbiol. – 1998. – V. 170. – P. 162–170.
- Hench L. L. Biomaterials: a forecast for the future // Biomaterials. – 1998. – V. 19. – P. 1419–1423.
- Herring J. M., Webb A. Nucleating agents for 3-hydroxybutyrate polymer compositions // European Patent № 400855. – 1990.
- Heuer A., Fink D., Laraia V. Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach // Science. – 1992. – V. 255. – P. 1098–1105.
- L'Heureux N., Germain L., Labbe R., Auger F. A. *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study // J. Vasc. Surg. – 1993. – V. 17. – P. 499–509.
- L'Heureux № , Paquet S., Labbe R., Germain L., Auger F. A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel // The FASEB J. – 1998. – V. 12. – P. 47–56.
- Hiki S., Miyamoto M., Kimura Y. Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [RS]-poly(3-hydroxybutyrate) and its utilization to block copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer // Polymer. – 2000. – V. 41. – P. 7369–7379.
- Hirai J., Matsuda T. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen-tissue regeneration process // Cell Transplant. – 1996. – V. 5. – P. 93–105.
- Hiraide A., Katayama M. Use of 3-hydroxybutyric acid as an energy source // European Patent Application № 355 453 A2. – 1990.

- Hirt T. D., Neuenschwander P., Suter U. W. Telechelic diols from poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly{[(R)-3-hydroxybutyric acid]-co-[(R)-3-hydroxyvaleric acid]} // *Macromol. Chem. Phys.* – 1996. – V. 197. – P. 1609–1614.
- Hisano N., Morikawa N., Iwata H., Ikada Y. Entrapment of islets into reversible disulfide hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – V. 40. – P. 115–123.
- Hocking P. J., Marchessault, R. H. Biopolyesters // in: *Chemistry and technology of biodegradable polymers* (Griffin G. J, ed.). Glasgow: Blackie. – 1994. – P. 48–96.
- Hocking P. J., Timmins M. R., Sherer T. M., Fuller R. C., Lenz R. W., Marchessault R. H. Enzymatic degradability of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) as a function of tacticity // *J. Macromol. Sci Pure Appl Chem A.* – 1996 – V. 32. – P. 889–894.
- Hoerstrup S. P., Zund G., Ye Q., Schoeberlein A., Schmid A. C., Turina M. Tissue engineering of a bioprosthetic heart valve: stimulation of extracellular matrix assessed by hydroxyproline assay // *ASAIO J.* – 1999. – V. 45. – P. 397–402.
- Hoerstrup S. P., Sodian R., Dzebris S., Wang J., Bacha E. A., Martin D. P., Moran A. M., Gulserian K. J., Speling J. S., Vacanti J. P., Schoen F. J., Mayer J. E. Functional trileaflet heart valves grown *in vitro* // *Circulation.* – 2000. – V. 102. – P. 44–49.
- Hoffman A. S. Molecular bioengineering of biomaterials in the 1990s and beyond: a growing liaison of polymers with molecular biology // *Artif. Organs.* – 1992. – V. 16, № 1. – P. 43–49.
- Hoffman A. S. «Intelligent» polymers in medicine and biotechnology // *Artif. Organs.* – 1995. – V. 19, № 5. – P. 458–467.
- Holland S. J., Tighe B. J., Gould P. L. Polymers for biodegradable medical devices. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems // *J. Controlled Release.* – 1986. – V. 4. – P. 155–180.
- Holland S. J., Jolli A. M., Yasin M., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. II. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydrolytic degradation studies // *Biomaterials.* – 1987. – V. 8, № 3. – P. 289–295.
- Holland S. J., Yasin M., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. VII. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: degradation of copolymers and their blends with polysaccharides under *in vitro* physiological conditions // *Biomaterials.* – 1990a. – V. 11, № 3. – P. 206–215.
- Holland S. T., Yasin M., Tighe B. J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate reinforced with hydroxyapatite // *J. Biomed. Engin.* – 1990b. – V. 12, № 2. – P. 102–104.
- Holmes P. A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic // *Phys. Technol.* – 1985. – V. 16. – P. 32–36.
- Holmes P. A // US Patent № 4 620 999. – 1986.

- Holmes P. A. Biologically produced  $\beta$ -3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers // In: Developments in crystalline polymers (Bassett D. C, ed.) London: Elsevier. – 1988. – V. 2. – P. 1–65.
- Homsy C., Armeniodes C. D. Biomaterials for skeletal and cardiovascular applications // Interscience Publishers. New-York. –1972. – 118 p.
- Howells E. R. Opportunities for biotechnology for the chemical industry // Chem. Ind. – 1982. – V. 8. – P. 508–511.
- Hrobak O. Industrial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate // FEMS Microbial. Rev. –1992. – V. 103. – P. 251–256.
- Hu Y., Grainger D. W., Winn S. R., Hollinger J. O. Fabrication of poly( $\beta$ -hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 59, № 3. – P. 563–572.
- Hu Y., Winn S. R., Krajbich I., Hollinger J. O. Porous polymer scaffolds surface modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation *in vitro* // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – V. 64A, № 3. – P. 583–590.
- Hua F. J., Kim G. E., Lee J. D., Son Y. K., Lee D. S. Macroporous poly(L-lactide) scaffold 1. Preparation of a macroporous scaffold by liquid – liquid phase separation of a PLLA – dioxan – water system // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 63, № 2. – P. 161–167.
- Hughes R. D., Williams R. Use of bioartificial and artificial liver support devices // Semin. Liver Dis. – 1996. – V. 16. – P. 435–444.
- Huijberts G. N. M., Eggink G., de Waard P., Huisman G. W., Witholt B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers // Appl. Environ. Microbiol. –1992. – V. 58. – P. 536–544.
- Huijberts G. N. M., Eggink G. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 46. – P. 233–239.
- Huisman G. W., De Leeuw O., Egging G., Witholt B. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) is a common feature of fluorescent pseudomonads // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – V. 55. – P. 1949–1954.
- Huisman G. W., Wonink E., Meima R., Kazemier B., Terpstra P., Witholt B. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) PHAs by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266. – P. 2191–2198.
- Hunter A. S., Long W. J., Ryrie C. C. An evaluation of gamma hydroxybutyric acid in paediatric practice // Br J. Anaesth. – 1971. – V. 43. – P. 620–627.
- Hutmacher D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. – 2001. – V. 12, № 1. – P. 107–124.

- Hustede E., Steinbüchel A. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroide* // Biotechnol. Lett. – 1993. – V. 15. – P. 709–714.
- Inagaki K., Kan Y., Takahashi S. Biodegradable polyester monofilaments and their manufacture (Chikyu Kankyo Sangyo Gijustu KK) // Japanese Patent № 08218216. – 1996.
- Inoue Y., Yoshie N. Structure and physical properties of bacterial synthesized polyesters // Prog. Polym. Sci. – 1992. – V. 17. – P. 571–610.
- Ishikawa K. Flexible triempler for use as a medical bag // US Patent № 5 480 394. – 1996.
- Ishizaki A., Tanaka K., Taga № Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub> // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – V. 57. – P. 6–12.
- Iwata H, Kobayashi K., Tagaki T., Oka T., Yang H., Amemiya H., Tsuji T., Ito F. Feasibility of agarose microbeads with xenogeneic islets as a bioartificial pancreas // J. Biomed. Mater. Res. – 1994. – V. 28. – P. 1003–1011.
- Iwata T., Doi Y. Crystals structure and biodegradation of aliphatic polyesters crystals // Macromol. – 1997. – V. 30. – P. 5290–5296.
- Iwata T., Doi Y., Naakayama S., Sasatzuki H., Teramachi S. Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* // Macromol. – 1999. – V. 25. – P. 169–176.
- Iwata T., Aoyagi Y., Ymane H., Doi Y. Mechanical properties, high ordered structure and biodegradability of P(3HB) films, fibers and lamellar crystals // In: Abstract of Int. Symp. Biol. Polym. ISBP–2002. Germany. Münster. 22–26 Sept. – 2002. – P. 48.
- Fakoussa R. M., Hofrichter M. Biotechnology and microbiology on coal degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 25–40.
- Findlay R. H., White D. C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – V. 45. – P. 71–78.
- Floccari, S., Lopez N. I., Mendez B. S., Pieper–Furst U., Steinbüchel A. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis // Can. J. Microbiol. – 1995. – V. 41(Suppl. 1). – P. 77–79.
- Forri D., Bee G., Kreuzer M., Wenk C. Novel biodegradable plastics in sheep nutrition. 2. Effect of NaOH pretreatment of poly(3-hydroxybutyrate) on *in vivo* digestibility and on *in vitro* disappearance // J. Ann. Physiol. Nutr. – 1999 a. – V. 81. – P. 41–50.
- Forri D., Wenk C., Bee G. Digestive utilization of novel biodegradable plastic in growing pigs // Ann. Zoolog. – 1999b. – V. 48. – P. 163–171.
- Freischlag J., Moore W. Clinical experience with a collagen-impregnated knitted Dacron vascular graft // Ann. Vasc. Surg. – 1990. – V. 3. – P. 895–903.

- Fuchtenbuch B, Steinbüchel A. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 52. – P. 91–95.
- Fuchtenbuch B., Wullbrandt D., Steinbüchel A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – V. 53. – P. 167–172.
- Fucui, T., Y. Doi. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae* // J. Bacteriol. – 1997. – V. – 179. – P. 4821–4830.
- Fukada. E., Ando. Y. Piezoelectric properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and copolymers of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate // Int. J. Boil. Macromol. – 1986. – V. 8. – P. 361–366.
- Fukui T., Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plants oils by *Alcaligenes eutrophus* and recombinant strain // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 49. – P. 333–336.
- Fuller R. Clinton. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes // In. J. Biological Macromol. – 1999. – V. 25/ – P. 21–29.
- James S. J., Pogribna M., Miller B. J., Bolon B., Muskhelishvili L. Characterization of cellular response to silicone implants in rats: implications for foreign – body carcinogenesis // Biomaterials. – 1997. – V. 18. – P. 667 –675.
- Janes B., Hollar J., Dennis D. Molecular characterization of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway of *Alcaligenes eutrophus* // In: Novel biodegradable microbial polymers. E. A. Dawes, ed. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands. – 1990. – P. 175–190.
- Jendrossek D. Microbial degradation of polyesters // Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. – 2001. – V. 71. – P. 293–325.
- Jendrosser D., Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates // Annu. Rev. Microbiol. – 2002. – V. 56. – P. 403–432.
- Jendrossek D., Schirmer A., Schlegel H. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 46. – P. 451–463.
- Jones R. D., Price J. C., Studemann J. A., Bowen J. M. *In vitro* and *in vivo* release of metoclopramide from a subdermal diffusion matrix with potential in preventing fescue toxicosis in cattle // J. Controlled Release. – 1994. – V. 30. – P. 35–44.
- Jones N., Cooper J., Waters R., Williams D. Absorbtion profile and biological response of calcium phosphate filled PLA and PHB/V // In: Synthetic bioabsorbable polymers for implants. (C. M. Agrawal, J. E. Pacr, S. T. Lin, eds.) – Scranton: ASTM. – 2000. – P. 69–82.
- Joshi A. K., Smith S. Construction, expression, and characterization of a mutated animal fatty acid synthase deficient in the dehydrase function // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 22508–22513.

- Jauregui H. O., Chowdhury N. R., Chowdhury J. R. Use of mammalian liver cells for artificial liver support // *Cell Transplant.* – 1996. – V. 5. – P. 353–367.
- Juni K., Nakano M. Poly(hydroxy acids) in drug delivery // *CRC Crit. Rev. The Drug Carrier Syst.* – 1987. – V. 3. – P. 209–232.
- Kang I.-K. Choi S.-H., Shin D.-S., Yoon S. C. Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2001. – V. 28. – №.3. – P. 205–212.
- Kanewasa Y., Tanahashi N., Doi Y., Saito T. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxyalkanoates) // *Polymer Degrad. and Stability.* – 1994. – V. 45. – P. 179–185.
- Kao W. J., Zhao Q. H., Hiltner A., Anderson J. M. Theoretical analysis of *in vivo* macrophage adhesion and foreign body giant cells formation on polydimethylsiloxane, low density polyethylene and polyetherurethane // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1994. – V. 28. – P. 73–79.
- Karp J. M., Shoichet M. S., Davies J. E. Bone formation on two dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds *in vitro* // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – V. 64A, № 2. – P. 388–396.
- Kassab A. Ch., Xu K., Denkbaz E. B., Dou Y., Zhang S., Piskin E. Riphampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as potential chemoembolization agent // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* – 1997. – V. 8 – P. 947–961.
- Kassab A. Ch., Piskin E., Bilgis S., Denkbaz E. B., Xu K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: *in vivo* studies // *J. Bioact. Compat. Polym.* – 1999. – V. 14. – P. 291–303.
- Kasuya K., Inoue Y., Yamada K., Doi Y. Kinetics of surface hydrolysis of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 // *Polym. Degrad. Stab.* – 1995. – V. 48. – P. 167–174.
- Kato M., Bao H. J., Kang C. K., Fukui T., Doi Y. Production of a novel copolyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas sp.* 61-3 from sugars // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – V. 45. – P. 363–370.
- Kato T., Yuguchi D., Yoshii H., Shi H., Shimizu K. Dynamics and modeling on fermentative production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus* // *J. Biotechnol.* – 1999. – V. 67. – P. 113–134.
- Katsuhiko T. Biopol properties and processing (In: Biodegradable and polymer Y. Doi and K. Fukuda Eds.) Amsterdam: Elsevier. – 1994. – P. 362–387.
- Kauffman T., Brady F. X., Puleyyi P. P., Raykovitz G // US patent 5 169 889. – 1992.
- Kawaguchi T., Tsugane A., Higashide K., Endoh H., Hasegawa T., Kanno H., Seki T., Juni K., Fukusbima S., Nakano M. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix. Antitumor activity and release



profiles of 2,3-diacy-5-fluoro-2-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres // J. Pharm. Sci. – 1992. – V. 81. – P. 508–512.

- Kazyuya H., Tetsuo A., Motoko Y., Masayuki T. Laminate and its production // Japanese Patent № 06270368. – 1994.
- Kharenko A. V., Iordanskii A. L. Dilhazem release from matrix on polyhydroxybutyrate // Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater. – 1999. – V. 26. – P. 919–920.
- Kim B. S., Lee S. Y., Chang H. N. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *E. coli* // Biotechnol. Lett. –1992a. – V. 14. – P. 811–816.
- Kim Y. B., Lenz R. W., Fuller R. C. Poly(3-hydroxyalkanoate) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. // Macromol. –1992b. – V. 25. – P. 1852–1857.
- Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control // Biotechnol. Bioeng. –1994a. – V. 43. – P. 892–898.
- Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using on-line glucose analyser // Enzyme Microbial Technol. – 1994b. – V. 16. – P. 556–561.
- Kim D. Y., Kim Y. B., Rhee Yha. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) bearing carbon-carbon triple bonds // Macromol. – 1998. – V. 32. – P. 4760–4763.
- Kim C. H., Hong W. K., Lee I. Y., Choi E. S., Rhee S. K. Enhanced production of D- $\beta$ -hydroxybutyric acid) through strain improvement // J. Biotechnol. – 1999. – V. 69. – P. 75–79.
- Kim G. J., Bang K. H., Kim Y. B & Rhee Y. H. Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha* // Biotechnology letters. –2000. – V. 22, № 18. – P. 1487–1492.
- King P. P. Biotechnology, an industrial view // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1982. – V. 32. – P. 2–8.
- Kitamura S., Doi Y. Production of copolyesters from organic acid by mutant strains of *Alcaligenes eutrophus* // In: (Y. Doi and K. Fukuda, eds., Biodegradable plastics and polymers). Elsevier Biomedical Press: Amsterdam. – 1994. – V. 12. – P. 373–378.
- Klinke S., Ren Q., Witholt B., Kessler B. Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli* // Appl. Envir. Microbiol. –1999. – V. 65. – P. 540–548.
- Knowles J. C., Mahmud F. A., Hasting G. W. Piezoelectric characteristics of a polyhydroxybutyrate-based composite // Clin. Mater. – 1991. – V. 8. – P. 155–158.

- Knowles J. C., Hastings G. W., Ohita H., Niwa S., Baeree N. Development of a degradable composite for orthopedic use: *in vivo* biomechanical and histological evaluation of two bioactive degradable composites based on the polyhydroxybutyrate polymer // *Biomaterials*. – 1992. – V. 13. – P. 491–496.
- Knowles J. C., Hastings G. W. *In vitro* and *in vivo* investigation of a range of phosphate glass-reinforced polyhydroxybutyrate based on degradable composites // *J. Material. Sci.* – 1993a. – V. 4. – P. 102–106.
- Knowles J. C., Hastings G. W. Physical properties of a degradable composite for orthopaedic use which attaches bone // *Proceeding First Int. Conference on Intelligent Materials* (Takagi T, ed.). Lancaster: Technomic. – 1993b. – P. 495–504.
- Kobayashi G., Shiotani T., Shima Y., Doi Y. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas sp.* OL-338 and *Aeromonas sp.* FA440 // In: (Y. Doi and K. Fukuda, eds.). *Biodegradable plastics and polymers*. Amsterdam. Elsevier. – 1994. – P. 410–416.
- Korkusuz F., Korkusaz P., Eksioğlu F., Gürsel İh., Hasirci V. *In vivo* response to controlled antibiotic release systems // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – V. 55, № 2. – P. 217–228.
- Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H. M., Braunegg G., Lafferty R. M. Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure – ein biologisch abbaubarer Arzneistoffträger zur Libationsverzögerung // *Pharm. Ind.* – 1983a. – V. 45, № 10. – P. 1004–1009.
- Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H. M., Braunegg G., Lafferty R. M. Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure – ein biologisch abbaubarer Arzneistoffträger zur Libationsverzögerung // *Pharm. Ind.* – 1983b. – V. 45, № 5. – P. 525–527.
- Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H. M., Egger G., Pfrager R., Walser V. Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid – a biodegradable carrier for long term medication dosages. Studies on compatibility of Poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid implantation tablets in tissue culture and animals // *Pharm. Ind.* – 1984. – V. 46. – P. 952–954.
- Korsatko W., Korsatko H., Lafferty R. M., Weidmann V. The influence of the molecular weight of poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid on its use as a matrix for sustained drug release // *Proceeding, Third European Congress of Biopharmacology and Pharmacokinetics*. – 1987. – P. 234–242.
- Korsatko–Wabnegg B., Korsatko W. Polyhydroxyalkanoates as drug carriers for the formulation of tablets with «quick-release» effect // *Pharmazie*. – 1990. – V. 45, № 9. – P. 691–692.
- Kostopoulos I., Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer // *Clin. Oral Impl. Res.* – 1994a. – V. 5. – P. 66–74.

- Koyama N., Doi Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus* // *Biotechnol. Lett.* – 1995. – V. 17. – P. 281–284.
- Koyama N., Doi Y. Miscibility of binary blends of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] // *Polymer.* – 1997. – V. 38. – P. 1589–1593.
- Kronenthal R. L., Oser Z., Martin E. *Polymers in medicine and surgery* // Plenum Press: N.-Y. –1975.
- Kubota M., Nakano M., Juni K. Mechanism of enhancement of the release rate of aclarubicin from  $\beta$ -polyhydroxybutyric acid microspheres by fatty acid esters // *Chem. Pharm. Bull.* – 1988. – V. 36. – P. 333–337.
- Kumagai Y., Doi Y. Physical properties and biodegradability of blends of isotactic and atactic poly(3-hydroxybutyrate) // *Macromol. Chem. Rapid. Commun.* – 1992a. – V. 13. – P. 179–183.
- Kumagai Y., Kanasawa Y., Doi Y. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films // *Macromol. Chem.* – 1992a. – V. 193. – P. 53–57.
- Kumagai Y., Doi Y. Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers // *Polymer Degradation and Stability.* – 1992b. – V. 37. – P. 253–256.
- Kunioka M., Kawaguchi Y., Doi Y. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998a. – V. 30. – P. 569–573.
- Kunioka M., Nakamura Y., Doi Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids // *Polym. Commun.* –1998b. – V. 29. – P. 174–176.
- Kusaka S., Iwata T., Doi Y. Properties and biodegradability of ultra-high molecular weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by recombinant *Escherichia coli* // *Int. J. of Biol. Macromol.* –1999. – V. 25. – P. 87–94.
- Kusaka S., Abe H., Lee S., Doi Y. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in recombinant *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – V. 47. – P. 140–143.
- Laborit H. Sodium 4-hydroxybutyrate // *Int. J. Neuropharmacol.* – 1964. – V. 43. – P. 433–452.
- Lacic I., Brissova M., Anilkumar A. C., Powers A. C., Wang T. New capsule with tailored properties for incapsulation of living cells // *J. Biomed. Mater. Research.* – 1998. – V. 39. – P. 52–60.
- Lanza R. P., Ecker D., Kuhlreibe W. M., Staruk J. E., Marsh J., Chick W. L. A simple method for transplanting discordant islets into rats using alginate gel spheres // *Transplantation.* – 1995. – V. 59. – P. 1485–1487.
- Leaf T. A., Peterson M. S., Stoup S. K., Somers D., Sreenc F. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate // *Microbiology.* –1996. – V. 142. – P. 1169–1180.

- Lee S. Y. Effects of growth temperature and nutritional components on the synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli* // Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1994. – V. 22. – P. 614–620.
- Lee S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates (review) // Biotechnol. and Bioengin. – 1996a. – V. 49. – P. 1–14.
- Lee S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria (reviews) // Tibtech. – 1996b. – V. 14. – P. 431–438.
- Lee S. Y. Poly(3-hydroxyalkanoate) production from xylose by recombinant *E. coli* // Bioprocess Engin. – 1998. – V. 18. – P. 397–399.
- Lee S. Y., Chang H. N. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures // J. Environ. Polymer Degrad. – 1994. – V. 2. – P. 169–176.
- Lee S. Y., Chang H. N. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studied. Can. J. Microbiol. – 1995. – V. 41 (Suppl 1). – P. 207–215.
- Lee H., Nevile K. Handbook of biomedical plastics // Pasadena Calif., Pasadena Technology Press. – 1998. – 312 p.
- Lee E. Y., Kang S. H., Choi C. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid)-co-3-hydroxyvalerate) by new isolated *Agrabacterium sp.* SH-1 and GW-014 from structurally unrelated single carbon substrates // J. Ferment. Bioeng. – 1995. – V. 79. – P. 328–334.
- Lee I. Y., Kim C. H., Yeon B. K., Hong W. K., Vhoi E. S., Rhee S. K., Park Y. H., Sung D. H., Baek W. H. High production of D-β-hydroxybutyric acid from methacrylic acid by *Candida rugosa* and its mutant // Bioprocess Engin. – 1997. – V. 16. – P. 247–252
- Lee S. Y., Choi Ji., Han K., Song J. Y. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, № 6. – P. 2762–2764.
- Leenstra T. S., Maltha J. C., Kuijpers–Lagtman A. Biodegradation of non-porous films after submucoperiosteal implantation on the palate of Heagle dogs // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 1995. – V. 6. – P. 445–450.
- Lemoingne M. Etudes sur l'autolyse microbienne: origine de l'acide β-oxybutyrique forme par autolyse // Ann. Inst. Pasteur. – 1927. – V. 41. – P. 148–165.
- Li S. H., De Wijn J. R., Layrolle P., De Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 61, № 1. – P. 109–120.
- Liao Ch.–J., Chen Ch.–F., Chen J.–H, Chiang Sh.–F., Lin Y.–J., Chang. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 59, № 40. – P. 676–681.

- Liggat J. J. Biodegradable polyester composition for blow molded bottles // US Patent № WO 94/28070. – 1994.
- Libergesell M., Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1993. – V. 38. – P. 493–501.
- Liebergesell M., Steinbüchel A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D // Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 209. – P. 135–150.
- Lin H.–R., Kuo Ch.–J., Yang C. Y., Shaw Sh.–Y., Wu Y.–J. Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – V. 63, № 3. – P. 271–279.
- Linhardt R. J., Flanagan D. R., Schmitt E., Wang H. T. Biodegradable polyesters and the delivery of bioactive agents // Poly. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.). – 1990. – V. 31. – P. 249–250.
- Liu J., Naik S., Santangini H., Trenkler D., Chowdhury J. R., Jauregui H. O. Characterization of immortalized porcine hepatocytes // Hepatology. – 1996a. – V. 24, № 4, Pt. 2, 197A. – P. 283.
- Liu J., Naik S., Santangini H., Trenkler D., Wolf D., Jauregui H. O. Comparison of immortalized porcine and rat hepatocytes // Hepatology. – V. 1996b. – V. 24, № 4, Pt. 2, 197A. – P. 284.
- Liu S. J., Steinbüchel A. A Novel Genetically Engineered Pathway for Synthesis of Poly(Hydroxyalkanoic Acids) in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 739–743.
- Lootz D., Kobow D., Zinner G., Michalic L., Behrend D., Schmitz K. P. Changes in the properties of polyhydroxybutyric due to sterilization // Biomed. Tech. – 1997. – V. 42, № 1. – P. 53–54.
- Lootz D., Holbe J., Behrend D., Schmitz K. P. Comparative studies of the degradation kinetics and effect on mechanical properties of polylactide and polyhydroxybutyric acid *in vitro* // Biomed. Tech. – 1998. – V. 43. – P. 428–429.
- Lootz D., Berhrend D., Kramer S., Freir T., Haubold A., Benkieser G., Schmitz K.–P., Becker B. Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – P. 2447–2452.
- Lopukhin Yu. M., Zuevsky V. V., Markin S. S., et al. LDL-apheresis on affine haemosorbents // Biomat., Artif. Cells, Artif. Organs. – 1990. – V. 18. – P. 571–578.
- Ly B., Wang Z. R., Yang H. Long-acting delivery microspheres of levo-norgestrol – poly(3-hydroxybutyrate): their preparation, characterization and contraceptive tests on mice // J. Microencapsulation. – 2001. – V. 18, № 1. – P. 55–64.

- Luizier W. D. Materials derived from biomass/biodegradable materials // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1992. – V. 89. – P. 839–842.
- Lukinska Z. B., Bonfield W. Morphology and ultrastructure of the interlace between hydroxyapatite – polyhydroxybutyrate composite implant and bone // J. of Mater. Sci.: Materials in Medicine. – 1997. – V. 8. – P. 379–383.
- Luo S., Netravali A. N. Characterization of henequen fibers and the henequen fiber/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) interface // J. Adhesion Sci. Technol. – 2001. – V. 15, № 4. – P. 423–437.
- Lundgren D. G., Pfister R. M., Merrick J. M. Structure of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) granules // J. Gen. Microbiol. – 1964. – V. 1. – P. 545–546.
- Lütke–Eversloh T., Bergander K., Luftmann H., Steinbüchel A. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 11–19.
- Luzier W. D. 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 839–842.
- Ma H.–L., Hung S.–C., Lin S.–Y., Chen Y.–L., Lo W.–H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulation in alginate beads // J. Biomed Mater Res. – 2003. – V. 64A, № 2. – P. 273–281.
- Madden L., Anderson A., Asrar J. Synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) polymer mixtures produced in high-density fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) // Macromol. – 1998. – V. 31. – P. 5660–5667.
- Madden L. A., Anderson A. J., Asrar J., Berger P., Garrett P. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures // Polymer. – 2000. – V. 41. – P. 3499 – 3505.
- Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – V. 63. – P. 21–53.
- Maekawa M., Pearce R., Marchessault R. H., Manley R. S. J. Miscibility and tensile of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) – cellulose propionate blends // Polymer. – 1999. – V. 40. – P. 1501 – 1505.
- Macrae R. M., Wilkinson J. F. The influence of cultural conditions on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium* // Proc. R. Phys. Edin. – 1958. – V. 27. – P. 73–78.
- Mamelak M. Gammahydroxybutyrate: an endogenous regulator of energy metabolism // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1989. – V. 13. – P. 187–198.
- Mamelak M., Scharf M. B., Woods M. Treatment of narcolepsy with  $\gamma$ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings // Sleep. – 1986. – V. 9. – № 1. – P. 285–289.
- McLeod B. J., Haresign W., Peters A., Humke R., Lamming G. The development of subcutaneous delivery preparations of GnRH for the induction of

ovulation in acyclic sheep and cattle // *Anion. Reprod.* – 1988. – V. 17. – P. 33–50.

- Malm T., Bowald S., Karacagil S., Bylock A., Buch C. A new biodegradable patch for closure of atrial septal defect. An experimental study // *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1992a. – V. 26, № 1. – P. 9–14.
- Malm T., Bowald S., Bylock A., Buch C. Prevention of postoperative pericardial by closure of the pericardium with absorbable polymer parches. An experimental study // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1992b. – V. 104, № 3. – P. 600–607.
- Malm T., Bowald S., Karacagil S., Bylock A., Busche C. A new biodegradable patch for closure of af atrial septal defect // *Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg.* – 1992c. – V. 26. – P. 9–14.
- Malm T., Bowald S., Bylock A., Buch C., Saldeen T. Enlargement of the right ventricular outflow tract and the pulmonary artery with a new biodegradable patch in transannular position // *Eur. Surg. Res.* – 1994. – V. 26, № 5. – P. 298–308.
- Mank R., Kala H., Richter M., Babel W., Slater K. Preparation of peroral sustained – release with a base of biodegradable polymers. Preparation of matrix tablets with a base of poly-3-hydroxybutyric acid // *Pfarmazia.* – 1989 a. – V. 44, № 3. – P. 545–547.
- Mank R., Kala H., Loranz A. Preparation of peroral delayed-action drug forms using biological polymers as the base. Preparation of erosion tablets with a base of starch hydrolysis products // *Pfarmazia.* – 1989b. – V. 44, № 9. – P. 617–618.
- Mank R., Kala H., Richter M. Preparation of drugs in extrusion pellets with a thermoplastic base. 1. Drug liberation // *Pfarmazia.* – 1989c. – V. 44, № 11. – P. 773–776.
- Marchant R., Hiltner A., Hamlin C., Rabinovitch A., Hobodkin R., Anderson J. *In vivo* biocompatibility studies. 1. The cage implant system and biodegradable hydrogel // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1983. – V. 17. – P. 301–325.
- Marchessault. R. H., Bluhm. T. L., Deslandes. Y., Hamer. G. K., Orts. W. J., Sundararajan. P. R., Taylor. M. G. Poly( $\beta$ -hydroxyalcanoates): biorefinery polymers in search of applications // *Macromol. Chem., Macromol. Symp.* – 1998. – V. 19. – P. 235–254.
- Marchessault R. H., Le Pourte P. F., Wrist P. E. // US patent 5 451 456. – 1995.
- Margiotta M. S., Benton L., Greco R. S. Endothelial cells adherent to expanded polytetrafluoroethylene express the intercellular adhesion molecule-1 // *J. Am. Coll. Surg.* – 1995. – V. 181. – P. 215–219.
- Marois Y., Zhang Z., Vert M., Deng X., Lenz R., Guidoin R. Effect os sterilization on the physical and structural characteristics of polyhydroxyoctanoate (PHO) // *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* – 1999a. – V. 10. – P. 469–482.

- Marois Y., Zhang Z., Vert M., Lenz R., Guidoin R. *In vivo* biocompatibility and degradation studies of polyhydroxyoctanoate in the rat: A new sealant for the polyestere arterial prothesis // *Tissue Eng.* – 1999b. – V. 5. – P. 369–386.
- Marois Y., Zhang Z., Vert M., Deng X., Lenz R., Guidoin R. Bacterial polyesters for biomedical applications: *In vitro* and *in vivo* assessment of sterilization, degradation rate and biocompatibility of poly( $\beta$ -hydroxyoctanoate (PHO) // In: *Synthesis bioabsorbable polymers for implants* (Agrawal C. M., Parr J. E., Lan S. T., eds.). Scrawal: ASTM. – 2000. – P. 12–38.
- Martin D. P., Gerngross T. U. Aspects of PHB granule formation *in vitro* // Abstracts of the 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. – NCR Research Press, Davos, Switzerland. – 1996. – P. 159–170.
- Martini F., Perazzo L., Vietto P. Manufacture of polymeric products // US Patent № 4880 592. – 1989.
- Martin D. P., Skraly F. A., Williams S. F. Polyhydroxyalkanoate compositions having controlled degradation rates // PCT Patent application . – № WO 99/32536. – 1999.
- Martin D. P., Peoples O. P., Williams S. F. Nutritional and therapeutic uses of 3-hydroxyalkanoate oligomers // PCT Patent Application № WO 00/04895. – 2000.
- Matsusaki H., Abe H., Taguchi K., Fukui T., Doi Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phC1* from *Pseudomonas* sp. 61–3 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 53. – P. 401–409.
- Mayer J. E., Shinoka T., Shum – Tim D. Tissue engineering of cardiovascular structures // *Curr. Opin. Cardiol.* – 1997. – V. 12. – P. 528–532.
- Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59. – P. 3233–3238.
- Mertens R. A., Ohara P. J., Hertzner № R., Krajewski L. P., Beven E. G. Surgical management of infrainguinal arterial prosthetic graft infections: Review of a thirty-five-year experience // *J. Vasc. Surg.* – 1995. – V. 21. – P. 782–791.
- Michalic I., Winkler J., Lootz D., Behrend D., Schimtz K. P. Roentgen contrasting of resorbable biomaterials PHB and PLA // *Biomed. Tech.* – 1998. – V. 43. – P. 426–427.
- Miguel O., Egiburu J. L., Iruin J. J. Blends of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with synthetic poly(3-hydroxybutyrate) and poly(epichlorohydrin): transport properties of carbon dioxide and water vapour // *Polymer.* – 2001. – V. 42. – P. 953–962.
- Miller N. D., Williams D. F. On the biodegradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers // *Biomater.* – 1987. – V. 8. – P. 129–137.



- Mitomo H., Hsieh W.-C., Nishiwaki K., Kasuya K., Doi Y. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Comamonas acidovorans* // *Polymer*. – 2000 – . V. 42. – P. 3455–3461.
- Mochizuki M., Kan Y., Takahashi S., Kanemoto N. Biodegradable biocomponent fibers // Japanese Patent № 05093316. – 1993a.
- Mochizuki M., Kan Y., Takahashi S., Kanemoto N., Muta Y. Biodegradable multifilaments of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) and their manufacture // Japanese Patent № 06264306. – 1994b.
- Molecular and cellular methods in developmental toxicology (G. P. Daston, ed.) // CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. – 1996.
- Molitoris H., Moss S., Koning J., Jendrossek D. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1996. – V. 46. – P. 570–579.
- Mooney D. J., Vacanti J. P. Tissue engineering using cells and synthetic polymers // *Transplant Rev.* – 1993. – V. 7. – P. 153–161.
- More G. S., Sauders S. M. Advances in biodegradable polymer // UK, Kapra. Shropshire. – 1998. – 1000 p.
- Mukai K., Doi Y., Tomita K. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases // *Biotechnol. Lett.* – 1993. – V. 15. – P. 601–604.
- Müller B., Jendrossek D. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1993. – V. 38. – P. 487–492.
- Müller H. M., Seebach D. Polyhydroxyalkanoates: a fifth class of physiologically important organic biopolymers? // *Angew Chem.* – 1993. – V. 32. – P. 477–502.
- Nakamura S., Doi Y., Scandola M. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // *Macromol.* – 1992. – V. 25. – P. 4237–4241.
- Nagata M, Machida T, Sakai W., Tsutsumi N. Synthesis, characterization, and enzymatic degradation studies on novel network aliphatic polyester // *Macromol.* – 1998. – V. 32. – P. 6450–6454.
- Nasseri B. A., Ogana K. Vacanti Y. O. Tissue engineering: an evolving 21<sup>st</sup> century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation // *Surgery*. – 2001. – V. 130. – P. 780–784.
- Natano R. V., Mantelatto P. E., Rossell C. E. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 57. – P. 1–5.
- Nawrath C., Poirier Y. Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch, and polyhydroxyalkanoates // *Mol. Breeding*. – 1996. – V. 1. – P. 105–122.

- Naughton G. Tissue engineering: new challenges // *ASAIO J.* – 1998. – V. 44. – P. 115–116.
- Nelson T., Kaufman E., Kline J., Sokoloff I. The extraneural distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyrate // *J. Neurochem.* – 1981. – V. 37. – P. 1345–1348.
- Niklason L. E., Gao J., Abbott V. M, Hirsch K. K, Houser S., Marini R., Langer R. Functional arteries grown *in vitro* // *Science.* – 1999. – V. 284. – P. 489–193.
- Nikolaev V. G. Peroral application of synthetic activated charcoal in USSR // *Biomat. Artif. Cells, Artif. Organs.* – 1990. – V. 18. – P. 555–568.
- Nikolaev V. G., Sarnatskaya V. V., Eretskaya E. V. Physical and biological modification of carbonic sorbents // *Clinical Materials.* – 1992. – V. 9. – P. 125–128.
- Nitschke M., Schmack G., Janke A., Simon F., Pleul D., Werner C. Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): Toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – V. 59, № 4. – P. 632–638.
- Nkere U. U., Whawell S. A., Saraff C. E., Schofield J. B., O'Keefe P. A. Pericardial substitution after cardiopulmonary bypass surgery: A trial of an absorbable patch // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1998. – V. 46. – P. 77–83.
- Nishimura, T., Saito, T., Tomita, K. Purification and properties of  $\beta$ -ketothiolase from *Zoogloea ramigera* // *Arch. Microbiol.* – 1978. – V. 116. – P. 21–27.
- Noda I. // US patent 5 536 564. – 1996a.
- Noda I. // US patent 5 489 470. – 1996b.
- Noisshiki Y., Komatsuzaki S. Medical materials for soft tissue use // Japanese Patent Application. № JP 7275344 A2. – 1995.
- Noishiki Y., Tomizawa Y., Yamane Y., Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation // *Nature Med.* – 1996. – V. 2. – P. 90–93.
- Odham G., Tunlid A., Westerdahl G., Marden P. Combined determination of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – V. 52. – P. 905–910.
- Oeding, V., Schlegel, H. G.  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism // *Biochem. J.* – 1973. – V. 134. – P. 239–248.
- Okamura K. and Marchessault R. H. X-ray structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate In: G. M. Ramachandran, ed. *Conformation of biopolymers.* New-York: Academic Press. – 1967. – V. 2. – P. 709–720.
- Ohgawara H., Kobayashi A., Kawamura M., Karibe S., Fu Q., Omori Y., Aka-ike T. Development of a method for embedded culture of pig pancreatic islet-like cell clusters in agarose containing maltose-carrying polystyrene (HEVM) and nicotinamide // *Cell Transplant.* – 1994. – V. 3. – P. 83–89.

- Ohkoshi I., Abe H., Doi Y. Miscibility and solid state structures for blends of poly[(S)-lactide] with atactic poly[(R, S)-3-hydroxybutyrate]. – 2000. – V. 41. – P. 5985–5992.
- Organ S. J., Barham S. Electron microscopic investigations of the structure and nucleation of polyalkanoate copolymers and blends // Polym. Prepr. – 1998. – V. 29. – P. 602.
- Organic/inorganic hybrid materials II (L. C. Klein, L. F. Francis, M. R. De Guire, J. R. Mark J. R, eds.) // MRS symposium proceedings. – 1999. – V. 576. – 465 p.
- Osseo-integrated implants, basics, materials, and joint replacements // (Heimke G, ed.), CRC Press, Boca Raton. – 1990. – V. 1.
- Page W. J. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1992. – V. 38. – P. 117–121.
- Page W. J., Knosp O. Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – V. 55. – P. 1334–1339.
- Page W. J., Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – P. 4236–4244.
- Park K., Shalaby W., Park H. Biodegradable hydrogel for drug delivery // Technomic Publ., Lancaster. – 1993.
- Park C. H., Damodaran V. K. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus* // . Biotechnol. Prog. – 1994. – V. 10. – P. 615–620.
- Park J.-S., Park H. C., Huh T. L., Lee Y. H. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned *phbCAB* genes // Biotechnol. Lett. – 1995. – V. 17. – P. 735–740.
- Park F., Gima L. G. *In vitro* cell response to differences in poly-L-lactide crystallinity // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – V. 31. – P. 117–130.
- Partnoy R. C. Plastics design library. Norwich: New-York. – 1998. – 215 p.
- Pasic M., Muller Glauser W., Odermatt B., Lachat M., Seifert B., Turina, M. Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small-diameter dacron grafts // Circulation. – 1995. – V. 92. – P. 2605–2616.
- Pazur R. J., Hocking P. J., Raymond S., Marchessault R. H. Crystal structure of syndiotactic poly(-hydroxybutyrate) from X-ray fiber and powder diffraction analyses and molecular modeling // Macromol. – 1998. – V. 32. – P. 6485–6492.
- Peoples O. P., Sinskey A. J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB gene (*phbC*) // J. Biol. Chem. – 1989a. – V. 264. – P. 15298–15303.

- Peoples O. P., Sinskey A. J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase // J. Biol. Chem. – 1989b. – V. 264. – P. 15293–15297.
- Peoples P. O., Saunders C., Nichols S., Beach L. Animal nutrition compositions // PCT Patent Application № WO 99/34687. – 1999.
- Poirier Y. Production of new polymeric compounds in plants // Curr. Opin. Biotechnol. – 1999. – V. 10. – P. 181–185.
- Pieper U., Steinbüchel A. Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber* // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – V. 96. – P. 73–80.
- Poirier Y., Dennis D. E., Klomparents K., Somerville C. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants // Science. – 1992. – V. 256. – P. 520–523.
- Poirier Y., Nawrath C., Somerville C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants // Bio-Technol. – 1995. – V. 13. – P. 142–150.
- Pokrovsky S. N., Adamova D. I., Benevolenskaya G. F. Immunosorbents for LDL-Apheresis // Biomat., Artif. Cells, Artif. Organs. – 1990. – V. 18. – P. 623–628.
- Poole–Warren L., Schindhelm K., Graham A. Performance of small diameter synthetic vascular prostheses with confluent autologous endothelial cell linings // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – V. 30. – P. 221–229.
- Pouton C. W., Akhtar S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery // Adv. Drug. Delivery Rev. – 1996. – V. 18. – P. 133–162.
- Pratt G. J., Smith M. J. A. Dielectric relaxation spectroscopy of a commercial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) // Eur. Polym. J. – 1999. – V. 35. – P. 909–914.
- Preusting H., van Houten R., Hoefs A., van Langenbaerghe E. K., Favre–Bulle O., Witholt B. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly(3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems // Biotechnol. Bioeng. – 1992. – V. 41. – P. 550–556.
- Preusting H., Hazenberg W., Witholt B. Continuous production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat // Enzyme Microb. Technol. – 1993. – V. 15. – P. 311–316.
- Pries A., Steinbüchel A., Schlegel H. Lactose- and galactose-utilizing strains of poly(hydroxyalkanoic acid)-accumulating *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas saccharophila* obtained by recombinant DNA technology // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – V. 33. – P. 410–417.

- Purushothaman M., Anderson R. K., Narayana S., Jayaraman V. K. Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) – biodegradable plastic // *Bioprocess. Biosystem. Engin.* – 2001 – V. 24. – P. 131–136.
- Puzyr A. P., Zhemchugova A. P., Churilov G. N. Biodegradable polymer is an alternative method of fullerene delivery to biological objects // In: Abstract of Int. Symp. Biol. Polym. ISBP – 2002). Germany. Münster. 22–26 Sept. – 2002. – P. –155.
- Quinteros R., Goodwin S., Lenz R., Park W. Extracellular degradation of medium chain length poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) by *Comamonas* sp // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1999. – V. 25. – № 1–3. – P. 135–143.
- Raitz C. R. H., Ulevitch R. J., Wringht S. D., Silbey C. H., Ding A., Athan C. F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eucaryotic signal transduction // *FASEB J.* – 1991. – V. 5. – P. 2652–2959.
- Ramsay B. A., Lomaliza K., Chavarria C., Dube B., Bataille P., Ramsay J. A. . Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56. – P. 2093–2098.
- Ramsay B. A., Saracovan I., Ramsay J. A., Marchessault R. H. Continuous reduction of long-side-chain poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – V. 57. – P. 625–629.
- Ramsay J. A., Berger E., Voyer R., Chavarie C., Ramsay B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents // *Biotechnol. Tech.* – 1995. – V. 8. – P. 589–594.
- Ranby B., Rabek J. F. ESR spectroscopy in polymer research Heidelberg // Springer-Verlag. – 1977. – 410 p.
- Ratner B. D. New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1993. – V. 27, № 7. – P. 837–850.
- Ratner B. D., Chikoti A., Castner D. G. Contemporary methods for characterizing complex biomaterials // *Clin. Materials.* – 1992. – V. 11. – P. 25–36.
- Reeve M. S., Mc Carthy S. P., Gross R. A. Preparation and characterization of Poly (R)-Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) – Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and (R)-Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) –Poly(lactide) degradable diblock copolymers // *Macromol.* – 1993. – V. 26. – P. 888–894.
- Rehm B. H. A., A. Steinbüchel. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other required for PHA synthesis // *Int. J. Biolog. Macromol.* – 1999. – V. 25. – P. 3–19.
- Ren Q., Kessler B., Witholt B. Production of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates: from *Pseudomonas* to *Escherichia coli*, p. 2-3 // In Abstracts Symp. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Dawos, Switzerland. – 1996.

- Reusch R. N., Sparrow A. W., Gardiner J. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma // *Biochim. Biophys Acta.* – 1992. – V. 1123. – P. 33–40.
- Reusch R. N., Reusch W. H. (1993a). US patent № 5 266 422.
- Reusch R. N., Reusch W. H. (1993b). US patent № RE035257.
- Rhee H. J., Birgh–DeWinter S. D. M., Dafms W. H. The differentiation of monocyte into macrophages, epithelioid cells in subcutaneous granulomass // *Cell Tis. Res.* – 1979. –V. 198. – P. 355–378.
- Rinehart J. A., Petersen M, Jonh M. Tissue-specific and developmental regulation of cotton gene Fb12A – demonstration of promoter activity in transgenic plants // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 112. – P. 1331–1341
- Ritschel E. T., Brade I., Seydel U., Zuhringer U., Kusumoto S., Brade H. Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains // In: *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host.* (E. Schrunner, M. N. Richmond, G. Seibert and U. Schwarz, eds.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. – 1988. – P.1–41.
- Rivard C. H., Chaput C., DesRosiers E. A., Yahia L. H., Selmani A. Fibroblast seeding and culture in biodegradable porous substrates // *J. Appl. Biomater.*1995. – V. 6, № 1. – P. 65–68.
- Rivard C. H., Chaput C., Rhalmi S., Selmani A. Bio – resorbable synthetic polyesters and tissue regeneration. A study of three-dimensional proliferation of ovine chondrocytes and osteoblasts // *Ann. Chir.* –1996. – V. 50, № 8. – P. 651–658.
- Rodrigues M. F. A., Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE, Steinbüchel A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypentanoic acid) from unrelated substances by *Burkholderia sp.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1995. – V. 43. – P. 880–886.
- Rouxhet L., Legras R., Schneider Y.–J. Interactions between biodegradable polymer poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate), proteins and macrophages // *Macromol Symp.* – 1998. – V. 130. – P. 347–366.
- Ruland W., Brit J. // *Appl. Phys.* – 1964. – V. 15. – P. 1301 – .1312.
- Rumisek J. D., Wade C. E., Brooks D. E., Okerberg C. V., Barry M. J., Clarke J. S. Heat-denatured albumin-coated Dacron vascular grafts: Physical characteristics and *in vivo* performance // *J. Vasc. Surg.* – 1986. – V. 4. – P. 136–143.
- Rutherford D., Hammar W. J., Babu G. N // US patent 5 614 576. – 1997.
- Ryu H. W., Hahn S. K., Chang Y. K., Chang H. N. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) in cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation // *Biotechnol. Bioeng.* –1997. – V. 55. – P. 28–32.
- Rutherford D., Hammar W. J., Babu G. N. // US patent 5 614 576. – 1997.
- Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suter U. W. Characterization of the cell response of cultured macro-

phages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – V. 30, № 4. – P. 429–439.

Saad B., Keiser O. M., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suter U. W. Multiblock copolymers as biomaterials *in vitro* biocompatibility testing // J. Materials. Sci.: Materials in Medicine. – 1997a. – V. 8, № 4. – P. 497–505.

Saad B., Hirt T. D., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suter U. W. Development of degradable polyesterurethans for medical applications: *in vitro* and *in vivo* evaluations // J. Biomed. Mater. Res. – 1997b. – V. 36, № 1. – P. 65–74.

Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suter U. W. Degradable and highly porous polyesterurethane foam as biomaterial: effects and phagocytosis of degradation products in osteoblasts // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – V. 39, № 4. – P. 594–602.

Saad B., Neuenschwander P., Uhlschmid G. K., Suter U. W. New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 25, № 1–3. – P. 293–301.

Saad B., Casotti M., Huber T. H., Schmutz P., Welti M., Uhlschmid G. K., Neuenschwander P., Suter U. W. *In vitro* evaluation of the biofunctionality of osteoblasts culture on Degra-Pol-foam // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. – 2000. – V. 11, № 8. – P. 787–800.

Saito T., Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans* // Int. J. Biol. Macromol. – 1994. – V. 16. – № 2. – P. 99–104.

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

Saito T., Saegusa H., Miyata Y., Fukui T. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zooglea ramigera* I-16-M // FEMS Microbiol. Rev. – 1992. – V. 103. – P. 333–338.

Saito T., Takizawa K., Saegusa H. Intracellular of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus* // Can. J. Microbiol. – 1995. – V. 41 (Suppl. 1). – P. 187–191.

Saito T., Nakamura S., Hiramitsu M., Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // Polym. Int. – 1996. – V. 39, № 3. – P. 169–174.

Salthouse T. N. Cellular enzyme activity at the polymer – tissue interface // J. Biomed. Mater. Res. – 1976. – V. 10, № 2. – P. 197–229.

Salthouse T. N., Matlaga B. F. Significance of cellular enzyme activity at nonabsorbable suture implant sites: silk, polyester, polypropylene // J. Syrg. Res. – 1975. – V. 19. – P. 127–132.

Salzmann D. L., Kleinert L. B., Berman S. S., Williams S. K. The effects of porosity on endothelialization of EPTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue // J. Biomed. Mater. Res. – 1997. – V. 34. – P. 463–476.

- Sadow J., Seidel H. R. // Germ. patent. – 86 – 049030. – 1986.
- Sadow J., Seidel H. R. // Germ. patent. – 89 – 146427. – 1989.
- Sato M., Asazuma T., Ishihara M., Kikuchi T., Masuoka K., Kikuchi M., Kurita A., Fujikawa K. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with membrane seal (ACHMS – scaffold) for the culture of annulus fibrosus cell from an intervertebral disc. // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – V. 64A, № 2. – P. 249–256.
- Scandola M., Ceccorulli G., Pizzoli M., Gazzano M. Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) // Macromol. – 1992. – V. 25. – P. 1405–1410.
- Schmitz K. P., Behrend D. Method of manufacturing intraluminal stents made of polymer material // Europent Patent Application. № 0 770 401 A2. – 1997.
- Schoen F. J., Levy R. J. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – V. 47. – P. 439–465.
- Scholz C. Poly(beta-hydroxyalkanoates) as potential biomedical materials: an overview // ACS Symp. Ser. (Polymers for resorbable materials) – 2000. – V. 764. – P. 328–334.
- Schubert P., Steinbüchel A., Schlegel H. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for the synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1988. – V. 170. – P. 5837–5847.
- Schubert P., Kruger N., Steinbüchel A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173. – P. 168–175.
- Senatore F., Shankar H., Venkataramani E. Development of biocompatible vascular prostheses // CRC Crit. Rev. in Biocompat. – 1988. – V. 4. – P. 281–340.
- Sendil D., Gürsel J., Wise D., Hasirci V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microspheres // In: Biomed. Sci. Technol. Proceeding . Fourth Int. Symp., 1997. A. A. Hincal., H. S. Kas, eds. New-York: Plenum Press. – 1998. – P. 89–96.
- Sendil D., Gürsel J., Wise D., Hasirci V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microspheres // J. Controll. Release. – 1999. – V. 59. – P. 207–217.
- Senior P. G. Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin // In: A. Dean, D. Ellwood, C. Evans, eds. Continuous culture. Ellis Horwood, Chichester, UK. – 1984. – V. 8. – P. 266–271.
- Senior P. G., Dawes E. A. The Regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* // Biochem. J. – 1973. – V. 134. – P. 225–238.
- Sevastianov V. I., Tseytlina E. A. The activation of the complement system by polymer materials and their blood compatibility // J. Biomed. Mater. Res. – 1984. – V. 18. – P. 969 – 978.



- Sevastianov V. Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials. // In: High performance biomaterials: A comprehensive guide to medical/pharmaceutical applications. Szycher M, ed. Technomic Press, Lancaster. – 1991. – P. 313–341.
- Sevastianov V. I., Shishatskaya E. I., Perova N. V., Volova T. G., Kalacheva G. S. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood // J. Biomaterial Science. – 2003. – (in press).
- Shahin M. M., Olley R. H. Novel etching phenomena in poly(3-hydroxy butyrate) and poly(oxyethylene) spherulites // J. Polymer Science: Polymer Physics. – 2002. – V. 40. – P. 124–133.
- Shapiro L., Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation // Biomaterials. – 1997. – V. 18. – P. 583–590.
- Shaw G. L., Melby M. K., Horowitz D. M., Sanders J. K. Nuclear magnetic resonance relaxation studies of poly(hydroxybutyrate) in whole cells and in artificial granules // Int. J. Biol. Macromol. – 1994. – V. 16, № 2. – P. 59–63.
- Shimamura E., Scandola M., Doi Y. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) // Macromol. – 1994. – V. 27. – P. 4429–2235.
- Shinoka T., Ma P. X, Shum–Tim D., Breuer C. K, Cusick R. A, Zund G., Langer R., Vacanti J. P, Mayer J. E. Jr. Tissue-engineered heart valves: autologous valve leaflet replacement study in a lamb model // Circulation. – 1996. – V. 94. – P. 164–168.
- Shinoka T., Shum – Tim D., Ma P. X, Tanel R. E, Isogai N., Langer R., Vacanti J. P, Mayer J. E. Jr. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1998. – V. 115. – P. 536–545.
- Shinomiya M., Iwata T., Doi Y. The adsorption of substrate-binding domain of PHB depolymerases to the surface of poly(3-hydroxybutyric acid) // Int. J. of Biol. Macromol. – 1998. – V. 22. – P. 129–135.
- Shiotani T., Kobayashi G. // US Patent. – 5 292 860. – 1994.
- Shoichet M. S., Li R. H., White M. L., Winn S. R, Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An *in vitro* comparison of alginate and agarose // Biotechnol. Bioeng. – 1996. – V. 50. – P. 374–381.
- Shum–Tim D., Stock U., Hrkach J., Shinoka T., Lien J., Moses M. A., Stamp A., Taylor G., Moran A. M., Landis W., Langer R., Vacanti J. P., Mayer J. E. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer // The Annal. Thorac. Surg. – 1999. – V. 68, № 6. – P. 2298–2304.
- Sim S. J., Shell K. D., Hogan S. A., Stubbe J., Rha C., Sinskey A. J. PHA syntase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo* // Nat. Biotechnol. – 1997. – V. 15. – P. 63–67.

- Slater S. C., W. H. Voige, D. E. Dennis. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway // J. Bacteriol. –1988. – V. 170. – P. 4431–4436.
- Slater S. C., Gallaher T., Dennis D. E. Production of poly-(3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain // Appl. Environ. Microbiol. –1992. – V. 58. – P. 1089–1094.
- Snezhkova E. A., Kolyadenko V. G., Nikolaev V. G. DNA-coated carbon adsorbents: Experimental assessment and results of severe psoriasis treatment // Biomat. Artif. Cells and Immobil. Biotechnol. – 1992. – V. 20. – P. 1201–1221.
- Sodian R., Sperling J. S., Martin D. P., Stock U., Mayer J. E., Vacanti J. P. Tissue engineering of a trileaflet heart valve. Early *in vivo* experiences with a combined polymer // Tissue Eng. – 1999. – V. 5. – P. 489–493.
- Sodian R., Hoerstrup S. P., Sperling J. S., Daebritz S. B., Martin D. P., Schoen F. J., Vacanti J. P., Mayer J. E. Tissue engineering of heart valves: *in vitro* experiences // The Annal. Thorac. Surg. – 2000a. – V. 70, № 1. – P. 140–144.
- Sodian R., Hoerstrup S. P., Sperling J. S., Martin D. P., Daebritz S., Mayer J. E., Vacanti J. P. Evaluation of biodegradable, threedimensional matrices for tissue engineering of heart valves // ASAIO J. – 2000b. – V. 46. – P. 107–110.
- Soldani G., Steiner M., Galletti P. Development of small-diameter vascular prostheses which release bioactive agents // Clinical Materials. – 1991. V. 8 – P. 81–88.
- Son H., Park G., Lee S. Growth-associated production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9 // Biotechnol. Lett. –1996. – V. 18. – P. 1229–1234.
- Spyros A., Kimmich R., Briese B., Jendrossek D.  $^1\text{H}$  NMR imaging study of enzymatic degradation in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for preferential degradation of amorphous phase by PHB depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei* // Macromol. – 1997. – V. 30. – P. 8218–82 25.
- Stein R. S. Polymer recycling: opportunities and limitations // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – V. 89. – P. 835–838.
- Steinbüchel A. Polyhydroxyalkanoic acids // In: D. Byron (ed.) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, New York. – 1990. – P. 124–213.
- Steinbüchel A. Biodegradable plastics // Curr. Opin. Biotechnol. –1992. – V. 3. – P. 291–297.
- Steinbüchel A. Thermoplastisch verformbare und biologisch abbaubare polyester aus bakterien: geeignete neue werkstoffe aus nachwachsenden rohstoffen? // CLB Chem. Labor Biotechnik. – 1993. – V. 44. – P. 378–384.

- Steinbüchel A. Presentation at the International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates – 94 // Montreal, Canada. – 1994.
- Steinbüchel A. Perspectives for the biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as successful Example // *Macromol. Biosci.* – 2001. – № 1. – P. 1–24.
- Steinbüchel A., Schubert P. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) – synthetic pathway in *Pseudomonas sp* // *Arch. Microbiol.* – 1989. – V. 153. – P. 101–104.
- Steinbüchel A., Hustede E., Liebergesell M., Pieper U., Timm A., Valentin H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 103. – P. 217–230.
- Steinbüchel A., Aerts K., Babel W., Föllner C., Liebergesell M., Madkour M. H., Mayer F., Pieper-Fürst V., Pries A., Valentin H. E., Wieczorek R. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions // *Can. J. Microbiol.* – 1995. – V. 41. – № 1. – P. 94–105.
- Steinbüchel A., Valentin H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – V. 128. – P. 219–228.
- Steel M. L., Norton-Berry P. Non-woven fibrous materials // US Patent № 4 603 070. – 1986.
- Steffl T., Schwarz S., Bolz A., Schaldach M. Exposure of the bioresorbable polymer poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) to various laser systems // *Biomed. Tech.* – 1997. – V. 42. – № 1. – P. 125–126.
- Shiotani T., Kobayashi G. // US patent 5 292 860. – 1994.
- Stock U. A., Sodian R., Herden T., Martin D., Egozy A., Vacanti J., Mayaer J. Influence of seeding techniques on cell-polymer attachment of biodegradable polymers – polyhydroxyalkanoates (PHA) // Abstract from the 2 Bi-Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. Orlando, Florida. – 1998 (December 4–6).
- Stock U., Nagashima M., Khalil P. N., Nollert G. D., Herden T., Sperling J. S., Moran A., Lien J., Martin D. P., Schoen F. J. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2000. – V. 119, № 4. – P. 732–740.
- Stokes K. Biodegradation // *Cardiovasc. Pathol.* – 1993. – V. 2. (Suppl.). – P. 111S–119S.
- Stuart E. S., Tehrani Ali, Valentin H. E., Dennis D., Lenz R. W., Fuller R. C. Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary // *J. Biotechnology.* – 1998. – V. 64. – P. 137–144.
- Sugimoto T., Tsuge T., Tanaka K., Ishizaki A. Control of acetic acid concentration by pH-stat continuous substrate feeding in heterotrophic culture phase of two-stage cultivation of *Alcaligenes eutrophus* for production of P(3HB)

from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> under non-explosive conditions // *Biotechnol. Bioengin.* – 1999. – V. 62. – P. 625–631.

- Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters // *Prog. Polym. Sci.* – 2000. – V. 25. – P. 1503–1555.
- Sun Y.–L., Ma X., Zhou D., Vacek I., Sun A. M. Porcine pancreatic islets: Isolation, microencapsulation, and xenotransplantation // *Artif. Organs.* – 1993. – V. 17. – P. 727–733.
- Sussman № L., Lake J. R. Treatment of hepatic failure – 1996. Current concepts and progress toward liver dialysis // *Am. J. Kidney Dis.* – 1996. – V. 27. – P. 605–621.
- Suzuki T., Yamane T., Shimizu S. Mass production of poly-β-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – V. 23. – P. 322–329.
- Suzuki T., Idogaki H., Kasai № A novel generation of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutyrate as C<sub>4</sub> chiral building unit using microbial dechlorination // *Tetrahedr. Asym.* – 1996. – V. 11. – P. 3109–3112.
- Suzuki T., Idogaki H., Kasai N. Dual production of highly pure methyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate and (S)-3-hydroxy-γ-butyrolactone with *Enterobacter sp.* // *Enzyme and Microbial Technology.* – 1999. – V. 24. – P. 13–20.
- Taidi B., Anderson A. J., Dawes E. A., Byron D. Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – V. 40. – P. 786–790.
- Takeda M., Matsuoka H., Ban H., Ohashi Y., Hikama M., Kolzumi J.–L. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant of *Sphaerotilus natans* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1995a. – V. 44. – P. 37–42.
- Takeda M., Matsuoka H., Hamana H., Hikama M. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant of *Sphaerotilus natans* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1995b. – V. 43. – P. 31–34.
- Takahashi H., Miyake M., Tokiwa Y., Asada Y. Improved accumulation of poly-3-hydroxybutyrate by a recombinant cyanobacterium // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – V. 20. – P. 183–186.
- Tal S., Smirnoff P., Okon Y. The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation // *Journal of General Microbiology.* – 1990. – V. 136. – P. 1191–1196.
- Tan I. K. P., Sudesh K., Theanmalar M., Gan S. N., Gordon III B. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – V. 47. – P. 207–211.

- Tanio T., Fucui T., Shirakura Y. An Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* // Eur. J. of Biochem. –1982. – V. 124. – P. 71–77.
- Tanaka K, Ishizaki A, Kanamaru T, Kawano T. Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus* // Biotethnol. Bioeng. – 1995. – V. 45. – P. 268–275.
- Taylor M. S., Daniels A. U., Andriano K. P., Heller J. Six bioabsorbable polymers: *in vitro* acute toxicity of accumulated degradation products // J. Appl. Biomater. – 1994. – V. 5, № 2. – P. 151–157.
- Tang S., Ai Y., Dong Z., Yang Q. Tissue response to subcutaneous implanting poly-3-hydroxybutyrate in rats // Disi fienyi daxue Xuebuo. –1999. – V. 20. – P. 87–89.
- Tasaki O., Hiraide A., Shiozaki T., Yamannora H., Sugimoto H. The dimer and trimer precursor of 3-hydroxybutyrate oligomers as of ketone bodies for nutritional care // (PEN) Parent. Enteral. Nutr. – 1998. – V. 23. – P. 321–325.
- Taylor P. L. // Patent WO 9 603 468. – 1996.
- Tesk J. A. Special report: NIST workshop on reference data for the properties of biomaterials // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – V. 58, № 5. – P. 463–466.
- Timm A., Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 209. – P. 15–30.
- Thomson R. C., Yaszemski M. J., Mikos A. G. In: Lanza R. P., Langer R., Chick W. L., eds. Principles of tissue engineering. // 1997 – V. 261. – Ch. 18. Austin, TX: RG Landes and Academic Press.
- Tokiwa Y., Ywamoto A., Takeda K. Biodegradable plastic composition, biodegradable plastic shaped body and method of producing same // US Patent № 5 124 371. – 1992.
- Tombolini R., Povolo S., Buson A, Squartini A., Nutl M. P. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41 // Microbiol. – 1995. – V. 141. – P. 2553–2559.
- Tomizava Y. Vascular prostheses for aortocoronary bypass grafting: a review // Artif. Organs. – 1995. V. 19. – P. 39–45.
- Türesin F., Gürsel I., Hasirci V. Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. – 2001. – V. 12, № 2. – P. 195–207.
- Ueda S., Yabutani T., Maehara A., Ymane T. Molecular analysis of the poly(hydroxyalkanoate) synthase gene from a methylotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* // J. Bacterial. – 1996. – V. 178. – P. 774–779.
- Underdorben M., Schywalsky M., Labahn D., Laenger F., Lootz D., Behrend D., Schmitz K., Schldach M., Nallbrancht C. Polyhydroxybutyrate (PHB) – stent experience in the rabbit // Am. J. Card. Trans. Cardiovascular. Therapeutics. – 1998. – Abstract TCT–11. – 5S.

- Unverdorben M., Spielberger A., Schywalsky M., Labahn D., Harting S., Schneider M., Looz D., Behrend D., Schmitz K., Degenhardt R., Schaldach M., Vallbracht C. A polyhydroxybutyrate biodegradable stent: preliminary experience in the rabbit // *Cardiovasc. Intervent. Radio.* – 2002. – V. 25. – P. 127–132.
- Urmeneta J., Jordi M., Guerrero R. Biodegradation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates in lake sediment sample increases bacterial sulfate reduction // *Appl. and Environ. Microbiol.* –1995. – V. 61. – P. 2046–2048.
- Valentin H. E., Steinbüchel A. Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic acid – synthase structural gene // *Appl. Microbiol. Lett.* –1993. – V. 39. – P. 309–317.
- Valentin H. E., Stuart E. S., Fuller R. C., Lenz R. W., Dennis D. Investigation of the function of proteins associated to polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas putida* BMO1 // *J. Biotechnology.* –1998. – V. 64. – P. 145–157.
- Van der Giessen W. J., Lincuff A. M., Schwartz R. S., van Beusekom H. M. M., Serruys P. W., Holmes D. R., Ellis S. G., Topol E. J. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries // *Circulation.* – 1996. – V. 94. – P. 1690–1697.
- Van Luyn M. J., Khouw I. M., van Wachem P. B., Blaauw E. H., Werkmeister J. A. Modulation of the tissue reaction to biomaterials. II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T cell-deficient rats // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – V. 39, № 3. – P. 398–406.
- Vickers M. D. Gamma hydroxybutyric acid // *Proc. R. Soc. Med.* – 1968. – V. 61. – P. 821–823.
- Veech R. L. Therapeutic compositions // PCT Patent Application № WO 98/41200 and WO 98/41201. –1998.
- Veech R. L. Therapeutic compositions // PCT Patent Application № WO 00/12432 – 2000.
- Volova T., Gueinov O., Kalacheva G., Medvedeva S., Pusir A. Effect of carbon monoxide on metabolism and ultrastructure of carboxydobacteria // *World Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1993. – V. 9, № 2. – P. 160–163.
- Volova T., Gitelson J., Terskov I., Sidko F. Hydrogen bacteria as a potential regenerative 1st component and producer of ecologically clean degradable plastic // *Life Support and Biosphere Science.* –1999. – V. 6., № 3 – P. 209–213.
- Volova T. G., Kalacheva G. S., Altuhova O. V. Autotrophic synthesis of PHAs by *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* –2002, V. 58, № 5, – P. 675–678.
- Volova T. G., Kalacheva G. S., Vasiliev A. D., Zeer E. P. A search for factors for the synthesis of PHAs with target properties // In: *Abstract of Int. Symp. Biol. Polym. ISBP* – 2002. Germany. Münster. 22–26 Sept. – 2002. – P. 149.

- Volova T. G., Voinov N. A. Kinetic parameters of a culture of the hydrogen-oxidizing bacterium *Ralstonia eutropha* grown under conditions favoring polyhydroxybutyrate biosynthesis // *Appl. Biochem. and Microbiol.* – 2003 – V. 39. – N.2. – P. 166–170.
- Volova T. G., Shishatskaya E. I., Sevastyanov V. I., Efremov S. N., Mogilnaya O. M. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers // *Biochemical Bioengin. J.* – 2003. – (in press).
- Volova T. G., Voinov N. A. Biosynthesis of biodegradable polymers polyhydroxyalkanoates (PHAs) on hydrogen of different origin: kinetic aspects. – In: «Reactions in condensed phase. kinetics and thermodynamics. – 2003» (in press).
- Waddington D. S. Polyhydroxyalkanoates and film formation therefrom // US Patent № WO 94/16000. – 1994.
- Wallen L. L., Rohwedder W. K. Poly- $\gamma$ -hydroxyalkanoate from activated sludge // *Environ. Sci. Technol.* – 1974. – V. 8. – P. 576–579.
- Wang F., Lee S. Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – V. 58. – P. 325–328.
- Wang D., Yamamoto T., Cakmak M. Processing characteristics and structure development in solid state extrusion of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) // *J. Appl. Polym.* – 1996. – V. 61. – P. 1957–1970.
- Wang M., Chen L. J., Weng J., Yue C. Y. Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering // *J. Mater. Science: Materials in Medicine.* – 2002. – V. 12. – P. 856–860.
- Wang J.-W., Hon M.-H. Sugar-mediated chitosan/poly(ethylene glycol)- $\beta$ -dicalcium pyrophosphate composite: mechanical and microstructural properties // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – V. 64A, № 2. – P. 262–272.
- Webb A. Tampon applicators and compositions for making same // European Patent № 0291024. – 1998.
- Webb A. // US patent № 4 900 299. – 1990.
- Webb A., Adsetts J. R. Wound dressings // UK Patent Application № 2 166 354. – 1986.
- West J. K. Theoretical analysis of hydrolysis of polydimethylsiloxane (PDMS) // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1997. – V. 35. – P. 505–511.
- Weinberg C. B., Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells // *Science.* – 1986. – V. 231. – P. 397–400.
- Williams D. F. Definitions in biomedical // *Progress in biomedical engineering.* Elsevier. N.-Y. – 1987. – 240 p.
- Williams M. S. // US patent 97 – 044 600. – 1997.

- Williams D. F., Miller N. D. The Degradation of polyhydroxybutyrate (PHB) // Biomater. Clin. Appl. – 1987. – V. 8. – P. 471–476.
- Williams M. D., Peoples O. P. Biodegradable plastic from plants // Chemtech. – 1996. – V. 26. – P. 38–44.
- Williams S. F., Peoples O. P. Making plastics green: PHA are the new generation of environmentally friendly plastics, easy to make with a little help from genetically engineered bacteria and plants // Chemistry in Britain. – 1997. – ( Dec). – P. 29–32.
- Williams S. F., Martin D. P. Therapeutic uses of polymers and oligomers composing gamma-hydroxybutyrate // PCT Patent Application № WO 01/19361A2. – 2001.
- Williams S. F., Martin D. P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy // in Series of Biopolymers in 10 vol. Ed. A. Steinbüchel. Wiley – VCY Verlag GmbH. – 2002. – V. 4. – P. 91–121.
- Williams M. D., Fiemo A. M., Grant R. A., Sherman DH Expression and analysis of a bacterial poly(hydroxyalkanoate) synthase in insect cells using baculovirus system // Protein Expression Purif. –1996a. – V. 7. – P. 203–211.
- Williams M. D, Rahn J. A., Sherman D. H. Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eukaryotic fatty acid synthase // Appl. Environ Microbol. – 1996 b. – V. 62. – P. 2540–2546.
- Williams S. K., Rose D. G., Jarrell B. E. Microvascular endothelial cell seeding of PTFE vascular grafts: improved patency and stability of the cellular lining // J. Biomed. Mater. Res. – 1994. – V. 28. – P. 203–212.
- Williams S. F., Martin D. P., Horowitz D. M., Peoples O. P. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 25, № 1–3. – P. 11–121.
- Withey R., Hay J. The effect of seeding on the crystallization of poly(hydroxybutyrate), and poly(hydroxybutyrate – co-hydroxyvalerate) // Polymer. – 1999. – V. 40. – P. 5147–5152.
- Wnuk A. J., Koger II T. J., Young T. A. Biodegradable, liquid-impervious multi-layer film compositions // US Patent № WO 94/00293. – 1994.
- Wong H. H., Lee S. L. Poly(3-hydroxybutyrate) production from they by high density cultivation of recombinant *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50. – P. 30–33.
- Wu Y., Zhao Q., Anderson J. M., Hiltner A., Lodoen G. A., Payt C. R. Effect of some additives on the biostability of a poly(etherurethane) elastomer // J. Biomed. Mater. Res. – 1991. – V. 25. – P. 725–739.
- Wu C., Gan Z. A novel method of studying polymer biodegradation // Polymer. – 1998. – V. 39. – P. 4429–4431.
- Xing. P., Dong. L., An. Y., Feng. Z., Avella. M., Martuscelli E. Miscibility and crystallization of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and poly(p-vinilphenol) blends // Macromolecules. – 1997. – V. 30. – P. 2726–2733.



- Yagmurlu M. F., Korkusuz F., Gürsel İh., Korkusaz P., Örs Ü., Hasirci V. Sulbactam – cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: In vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – V. 46, № 4. – P. 494–503.
- Yalpani M. // US patent 5 229 158. – 1993a.
- Yalpani M. // US patent 5 225 227 – 1993b.
- Yamada K., Kan Y., Murase S. Biodegradable composite fibers with Poly(hydroxyalkanoic acid) core and Poly(alkylene succinate) sheath // Japanese Patent № 073 24227. – 1995.
- Yamamoto T., Kimizsu M., Maekawa Y., Shinkawa T. High-strength biodegradable fibers of c-axis oriented crystals with other crystals and manufacture thereof // Japanese Patent № 07300720. – 1995.
- Yamamoto T., Kimizu M., Kikutani T., Furuhashi Y., Cakmak M. The effect of drawing and annealing conditions on the structure and properties of bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) fibers // Int. Polym. Process. – 1997. – V. 12. – P. 29–37.
- Yamane T., Chen X. F., Ueda S. Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols // FEMS Microbiol. Lett. –1996a. – V. 135. – P. 207–211.
- Yamane T., Fukunage M., Lee Y. W. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer // Biotechnol. Bioeng. – 1996b. – V. 50. – P. 197–202.
- Yamane H., Terao K., Hiki S., Kawahara Y., Kimura Y., Saito T. Processing melt spun polyhydroxybutyrate fibers // Polymer. – 2001a. – V. 42. – P. 3241–3249.
- Yamane H., Terao K., Hiki S., Kawahara Y., Kimura Y., Saito T. Enzymatic degradation of bacterial homo-poly(3-hydroxybutyrate) melt spun fibers // Polymer. – 2001b. – V. 42. – P. 7873–7878.
- Yang X., Zhao K., Chen G.–Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates // Biomaterials. – 2002. – V. 23. – P. 1391.
- Yanagi K., Miyoshi H., Ohshima N. Improvement of metabolic performance of hepatocytes cultured *in vitro* in a packed-bed reactor for use as a bioartificial liver // ASAIO J. – 1998. – V. 44. – P. 436–440.
- Yasin M., Holland S. T., Jolly A. M., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. VI. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: accelerated degradation of blends with polysaccharides // Biomaterials. – 1987. – V. 8, № 4. – P. 289–295.
- Yasin M., Holland S. T., Tighe B. J. Polymers for biodegradable medical devices. V. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: Effects of polymer processing on hydrolytic degradation // Biomaterials. – 1990. – V. 11, № 4. – P. 451–454.

- Yasin M., Tighe B. J. Polymers for medical devices: VII. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: physical and degradative properties of blends with polycaprolacton // *Clin. Materials*. – 1992a. – V. 10, № 2. – P. 21–28.
- Yasin M., Tighe B. J. Polymers for medical devices: VIII. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: physical and degradative properties of blends with polycaprolacton // *Biomaterials*. – 1992b. – V. 13, № 1. – P. 9–16.
- Yim K. S., Lee S. Y., Chang H. N. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – V. 49. – P. 495–503.
- Yokouchi M., Chatani Y., Tadokoro H., Teranisini K., Tani H. Structural studies of polyesters. V. Molecular and crystal structures of optically active of racemic Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) // *Polymer*. – 1973. – V. 14. – P. 248–255.
- Yokouchi M., Chatani Y., Tadokoro H., Tani H. Structural studies of polyesters. VII. Molecular and crystal structures of racemic Poly( $\beta$ -ethyl- $\beta$ -propiolactone) // *Polym. J.* – 1974. – V. 6. – P. 267–272.
- Yoon J. S., Kim J. Y. Cybernetic model for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus* // *Biotechnol. Bioeng.* – 1994. – V. 43. – P. 1043 – 1051.
- Yoon J. S., Kim J. Y., Rhee Y. H. Effects of amino acid addition on molar fraction of 3-hydroxyvalerate in copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate synthesized by *Alcaligenes sp.* SH-69 // *J. Ferment. Bioeng.* – 1995. – V. 80. – P. 350–354.
- Yoon J. S., Oh S. H., Kim M. N. Compatibility of poly(3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene-co-vinyl acetate) blends // *Polymer*. – 1998. – V. 39. – P. 2479 –2487.
- Yoon J. S., Lee W. S., Jin H.-J., Chin I.-J., Kim M.-N., Go Jin-H. Toughening of poly(3-hydroxybutyrate with poly(*cis*-1,4-isporen) // *Europ. Polymer J.* – 1999. – V. 35. – P. 781–788.
- Yoon J. S., Lee W. S., Kim K., Chin In. Kim M., Kim C. Effect of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lactide) on the poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/poly(L-lactid) blends // *Eur. Polymer J.* – 2000. – V. 36. – P. 435–442.
- Yoshie N., Goto Y., Inoe Y., Chujo R. Biosynthesis and NMR studies of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes eutrophus* H16 // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1992. – V. 14. – P. 118–121.
- Yu Ga-er., Marchessault R. H. Characterization of low molecular weight poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis // – 2000. – V. 41. – P. 1087–1098.
- Yuan. Y., Ruckenstein. E. Miscibility and transesterification of phenoxy with biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) // *Polymer*. – 1997. – V. 39. – P. 1893–1897.
- Zilla P., Deutsch M., Meinhart J., Puschmann R., Eberi T., Minar E., Dudczak R., Lugmaier H., Schmidt P., Noszian I. Clinical *in vitro*

endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years // *J. Vasc. Surg.* – 1994. – V. 19. – P. 540–548.

Zinner G., Behrend D., Schmitz K. P. Complement activation and liberation of cytokines from monocytes as indicators of biocompatibility of polyhydroxybutyric acid // *Biomed. Tech.* – 1997. – V. 42. – № 1. – P. 55–56.

Zinner G., Behrend D., Schmitz K. P. The hemostasis system as an indicator of hemocompatibility of implantant materials // *Biomed. Tech.* – 1998. – V. 43. – P. 432–433.

Zhang H., Obias V., Gonyer K., Dennis D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose – utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – V. 60. – P. 1198–1205.

Zhao Q. H., Anderson J. M., Hiltner A., Lodoen G. A., Payet C. R. Theoretical analysis on cell size distribution and kinetics of foreign-body giant cell formation *in vivo* on polyurethane elastomers // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1992. – V. 26. – P. 1019–1038.

Zund G., Hoerstrup S. P., Schoeberlein A., Lachat M., Uhlschmid G., Vogt R., Turina M. Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery; seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh // *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* – 1998. – V. 13. – P. 160–164.

Zhao K., Deng Y., Chen J. C., Chen G.–Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility // *Biomaterials.* – 2003. – V. 24. – P. 1041–1045.