

УДК 615.46

**ФОРМИРОВАНИЕ ПОРИСТЫХ БИОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ: ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И АЛГИНАТА НАТРИЯ С АНТИОКСИДАНТАМИ В УСЛОВИЯХ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ И МИКРОВОЛНОВОГО НАГРЕВА****М.А. Яковлева<sup>1</sup>, В.Н. Горшенев<sup>1</sup>, А.Е. Донцов<sup>1</sup>, Н.Л. Аронштам, Е.Л. Кучеренко<sup>2</sup>, А.А. Ольхов<sup>1,3</sup>***ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия**ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия*

Полимерные матрицы с антиоксидантами, лекарственными формами могут состоять из смеси синтетических и природных биоразлагаемых полимеров с гидрофобными и гидрофильными свойствами, с различными прочностными характеристиками и биоразлагаемыми свойствами. Комбинацией таких смесей можно изменять соотношение гидрофильных и гидрофобных участков в композициях, регулировать прочностные и биоразлагаемые свойства композитов. В работах [1–3] рассматриваются эффекты дозированного воздействия биологически активных веществ на протекание процессов в биологических объектах на различных уровнях организации живых систем. Перспективы применений биоконструктов, содержащих антиоксиданты, связаны как с их созданием, так и с их активным действием на область заболевания. Создание биоконструктов на основе биоразлагаемых полимеров с лекарственными формами, антиоксидантами позволяет осуществлять их дозированное, пролонгированное выделение при деструкции полимерной матрицы. В зависимости от физико-химических свойств биологически активных веществ (БАВ), особенностей механизма действия и области поступления в организм, доза биологической активности химических соединений может быть индифферентной для организма или проявлять свойство лекарства или яда. Применению в медицине антиоксидантов, выделяемых из лекарственных растений, а также других природных соединений для лечения различных заболеваний, посвящены многочисленные международные конференции, число которых в последнее время увеличивается в связи с активным применением природных антиоксидантов. Поэтому создание и изучение различных полимерных форм доставки антиоксидантов является актуальным направлением исследований.

В качестве природных антиоксидантов применяли оммохромы различного происхождения: выделенные из голов бабочки «Бражник табачный» и мухи «Черная львинка» [4]. На первом этапе работы осуществляли выделение биоактивных компонента оммохрома из голов насекомых. Муха «черная львинка» (*Hermetia illucens*, семейство Stratiomyidae) и ее личинки широко используются для питания сельскохозяйственных животных и конвертации биологических отходов в доступный источник пищевого белка, жиров, хитина и меланина. Чистая культура этих мух содержится в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова (ИПЭЭ РАН). Технология культивирования мух включает следующие стадии: содержание взрослых мух в инсектарии в контролируемых условиях; инкубация яиц и получение личинок в инкубаторе; выращивание личинок в контейнере с питательным субстратом; получение предкуколок, затем куколок и имаго. Взрослые мухи живут 5–8 дней. Нуклеотидная последовательность *Hermetia illucens* зарегистрирована в Генном банке (*Hermetia illucens*, sample H-il 1 No. KY817115). После окончания жизненного цикла подмор мух замораживали и хранили при температуре –180 °С. Бабочка табачный бражник (*Manduca sexta*, семейство Sphingidae). Гусеницы этой бабочки служат популярным кормом для насекомоядных экзотических животных. Культура содержится в энтомологическом отделе Московского зоопарка.

Экстракция оммохромов из голов насекомых была выполнена без их предварительной гомогенизации. Головы взрослых умерших насекомых были отделены вручную и хранились при температуре –180 °С. При необходимости головы насекомых были предварительно проинкубированы в нейтральном метаноле в соотношении ~ 10 г. голов на 300 мл метанола в течение суток (в темноте), при комнатной температуре и периодическом перемешивании. После фильтрации 500 мл абсолютного метанола, содержащего 1 % по объему хлористого водорода (MeOH-HCl смесь), были добавлены к массе голов и смесь инкубировали при 6 °С в темноте, в течение 48 ч при периодическом встряхивании. После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр (Ватман, Grade 6).

Полученный супернатант вишневого цвета нейтрализовали 20 %-ным раствором аммиака и центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, к осадку добавляли свежий раствор MeOH-HCl до его полного растворения. Процедуру осаждения оммохромов раствором аммиака повторяли дважды. Окончательно осадок оммохромов высушивали в эксикаторе в темноте в присутствии безводного хлорида кальция.

На втором этапе работы проводили оценку антиоксидантной активности биоактивных компонентов. Антирадикальную активность полученных оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [5]. В качестве измеряемых параметров был взят латентный период достижения максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu» RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности оммохромов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации пигмента. Среда для инкубации содержала 0,05 М К-фосфатный буфер, pH 7,4, 2,0 мкМ гемоглобина, 100 мкМ люминола, 100 мкМ ЭДТА, и различные концентрации биоактивных компонентов в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4 или в растворе метанол-HCl. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор без добавления биоактивных компонентов.

На третьем этапе работы проводили изготовление биокмполитов с применением биоразлагаемых полимеров и антиоксидантов в условиях ультразвукового диспергирования и микроволнового нагрева. Изготовление композитов на основе биоразлагаемых полимеров: поли-3-гидроксипропаната (немецкой фирмы "Biomer") – (ПГБ), поликапролактона (ПКЛ) (Shenzen Bright China Ind.) и природных антиоксидантов проводили путем смешения 7–10 % растворов полимеров в хлороформе с растворами природных антиоксидантов. В качестве дополнительного полимерного компонента использовали 3 % водный раствор альгината натрия.

В работе применяли две схемы смешения термодинамически не совместимых компонентов.

По первой схеме после ультразвукового диспергирования (УЗДН-А) в течение 1–3 минут смесь подвергалась микроволновому нагреву в СВЧ-печи (частота 2,45 ГГц, мощность 800 Вт, SHARP). В результате постепенного высушивания образовывались смешанные пористые полимерные композиции, содержащие антиоксиданты.

По второй схеме смешение раствора полимера осуществляли в цилиндрическом реакторе, в который помещали излучатель ультразвуковых колебаний (УЗДН-А). После 1–3 минут диспергирования смеси в реактор вводился слой воды. Над нижним слоем смеси полимеров с растворами антиоксидантов размещался слой воды высотой 3–5 см.

Подготовленный таким способом реактор помещался в СВЧ-печь (частота 2,45 ГГц, мощность 800 Вт, SHARP). В результате нагрева при взаимодействии с СВЧ-излучением на поверхности воды формировался пористый композит. Аналогичным способом из смеси полимера с раствором оммохрома были получены образцы композитов в виде плёнок (при смешении раствора полимера и раствора оммохрома в соотношении 8:1 и 6:1. При УЗ-диспергировании смеси с оммохромом образуется большое количество пены. Прогрев в СВЧ-печи в течение 1 минуты привел к кипению смеси и выбросу продукта из реактора в виде плёнки. Образец с большим содержанием оммохрома начинал кипеть через 15 секунд, что связано с пенообразованием композиции. Смешение полимера с раствором оммохрома проводили при соотношении компонентов 6:1. Смесь с оммохромом легко диспергировалась в течение 1 минуты до появления пены. В течение 30 сек СВЧ-нагрева образовался продукт смешения, рис. 1 а, б.

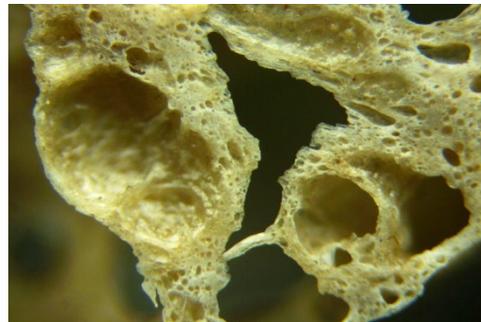
Смешение 10 % растворов ПКЛ в хлороформе проводили в условиях ультразвукового диспергирования с раствором оммохрома в метаноле. Смешение проводили при соотношении компонентов 8г (ПКЛ) и 1,5г раствора оммохрома. В результате нагрева в СВЧ-печи в течение 10 минут по 1 – одной минуте нагрева вес образца уменьшился в 10 раз.

Теплофизическими методами (ТГА, ДСК) проводили регистрацию смешения компонентов участвующих в процессе смешения. Термогравиметрический анализ (ТГА) образцов проводили на термомикровесах TG 209 F1 Iris фирмы «Netzsch» (Германия). Навески образцов составляли 5–8 мг,

анализ проводился при скорости нагревания 20 град/мин. Методом дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) определяли тепловые эффекты образующиеся при нагревании антиоксидантов и тепловые эффекты смешанных композиций (на сканирующем калориметре «Netzsch», Германия, модель DSC-204 F1) при скорости нагревания 10 град/мин в диапазоне 30–250 °С в токе инертного газа – аргона.



(a)



(б)

Рисунок 1 – Вспененные образцы композитных полимерных пен с оммохромом на основе ПКЛ (а) и ПГБ (б)

После смешения компонентов проводили этапы определения концентрации выхода антиоксиданта из полимерной матрицы и антиоксидантную активность биоактивного компонента. Для проведения спектральных исследований по определению выхода антиоксиданта – оммохрома из полимерных пористых матриц ПГБ и ПКЛ были приготовлены по первой экспериментальной схеме смеси в условиях ультразвукового диспергирования и микроволнового нагрева. При смешении раствора полимера и раствора оммохрома в соотношении (8:1 и 6:1, по массе) в ультразвуковом поле образуется большое количество пены.

Поскольку выход оммохрома происходил в фосфатный буферный раствор, была изучена стабильность этого соединения в воде в течение 48–144 часов. На рис. 2 приведены спектры оммохрома в УФ области спектрального диапазона в зависимости от времени экспозиции в фосфатном буфере.

Из рисунка видно, что химическая структура оммохрома практически не изменяется. Отсюда можно сделать вывод о стабильности этого соединения на протяжении всего периода высвобождения из полимерной матрицы. На рис. 3, показано, что этот период может составлять для различных матриц 7–9 суток.

Далее в работе приведены результаты спектральных исследований выхода оммохрома из полимерной матрицы и оценки антиоксидантной активности. Пролонгированное высвобождение антиоксиданта из пористого полимерного носителя создает необходимый терапевтический эффект. При этом механизм высвобождения на первом этапе определяется простой диффузией (до 3 суток для ПЛА и до 7 суток для ПГБ). Затем диффузия оммохрома сопровождается гидролизом полимерной матрицы. Как видно из пористого матрицы на основе ПКЛ оммохром выделяется значительно быстрее, по сравнению с ПГБ. Это объясняется высокой кристалличностью и жесткостью полимерных цепей последнего.

На рисунке 3 представлены данные по кинетике выхода оммохрома в буферный раствор из двух образцов биокомпозитов. Диффузионная кинетика была изучена спектральным методом. Зарегистрированный выход оммохрома в буферный раствор из биокомпозитных матриц на основе ПКЛ и ПГБ позволяет надеяться на удовлетворительный терапевтический эффект при применении данных материалов для медицинских целей.

Далее были проведены исследования антиоксидантной активности оммохрома, десорбированного из биокомпозитной матрицы. Антиоксидантная активность оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [5]. В качестве измеряемого параметра была взята максимальная амплитуда хемилюминесценции в контроле и в присутствии разных количеств антиоксидантов.

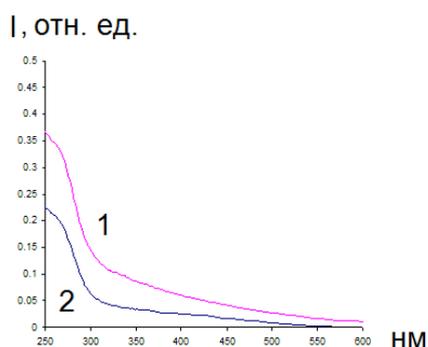


Рисунок 2 – Спектры поглощения оммохрома на вторые (1) и шестые (2) сутки биодegradации образца на основе ПКЛ в фосфатном буфере

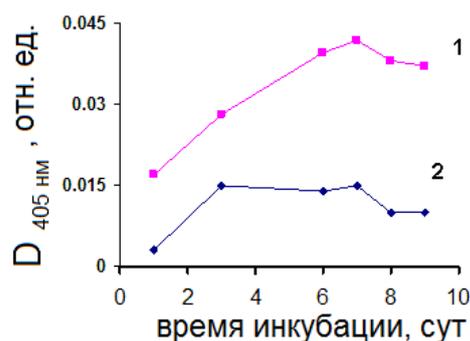


Рисунок 3 – Зависимость выхода оммохромов в буферном растворе в зависимости от времени инкубации материала при температуре 37 °С. 1 – образец на основе ПКЛ, 2 – образец на основе ПГБ

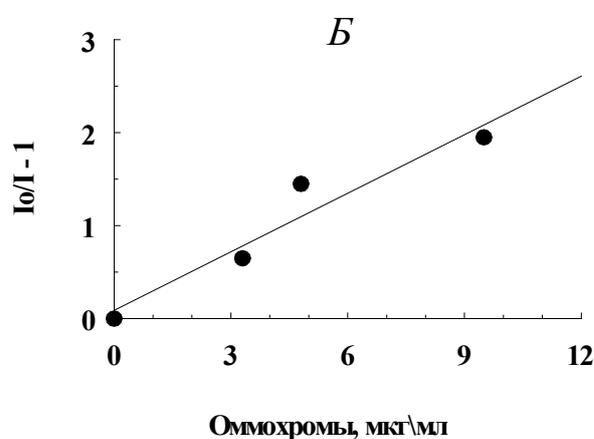
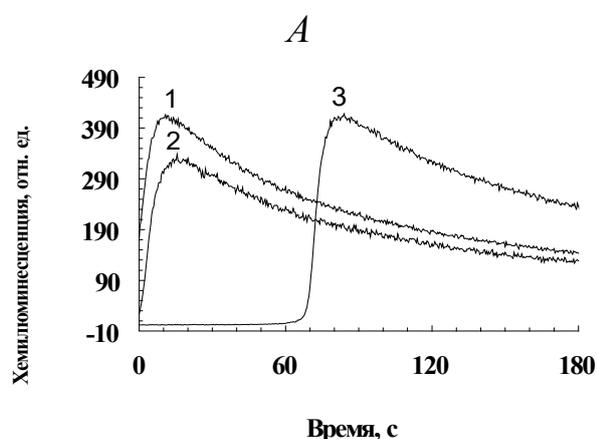


Рисунок 4 – Антиоксидантная активность оммохромов глаза мухи черная львинка (*Hermetia illucens*) высвобожденных из биокomпозитной полимерной матрицы. (А) Тушение хемилюминесценции люминола. Добавлено: 1 – исходные оммохромы; 2 – оммохромы, вышедшие в окружающую среду после разложения полимера; 3 – тролокс. (Б) Определение антиоксидантной активности оммохромов, освобожденных из полимера.  $I_0$  – интенсивность хемилюминесценции в отсутствии оммохромов;  $I$  – интенсивность хемилюминесценции в присутствии различных концентраций оммохромов; контролем служили пробы, содержащие чистый растворитель (MeOH-HCl)

Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu» RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм и комнатной температуре. Результаты сравнивали с действием водорастворимого аналога витамина Е тролокса (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Swiss), измеряя в тех же условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации тролокса.

Результаты показали, что оммохромы, освобожденные из полимера в результате его деградации не теряли своей антиоксидантной активности, которая для концентрации оммохромов в 1 г/л была в среднем эквивалентна антиоксидантной активности 4,0 мМ тролокса.

### Литература

1. Das A., Ringu T., Ghosh S. et al. A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers // Polym. Bull. 2023. 80, 7247–7312. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04443-4>
2. Pires P.C. et al. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration // European Polymer Journal. 2023. V. 187. P. 111868. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111868>.
3. Smola-Dmochowska A., Lewicka K., Masyk A., Rychter P., Pamuła E., Dobrzyński P. Biodegradable Polymers and Polymer Composites with Antibacterial Properties // Int. J. Mol. Sci. 2023. 24. 7473. <https://doi.org/10.3390/ijms24087473>
4. Romero Y. Antiradical capacity of ommochromes // J. Mol. Model. 2015. 21. 220. <http://doi.org/10.1007/s00894-015-2773-3>
5. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Измерение антиоксидантной активности плазмы крови в системе гемоглобин – пероксид водорода – люминол // Вопросы Мед. Химии. 1997. 43. 87–92.