

ВИДІЛЕННЯ ПОЛІГІДРОКСИБУТИРАТУ З МІКРООРГАНІЗМІВ ТА СПОСОБИ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ ЯК БІОМАТЕРІАЛУ

Прозор А. В., Країло О. О.

КПІ ім. І. Сікорського, prozor-bf11@iit.kpi.ua,
krailo-bf11@iit.kpi.ua, lutsenko.tetiana@iit.kpi.ua

Вступ. Серйозним наслідком стрімкого зростання виробництва та споживання пластмас у всьому світі є утворення великих обсягів використаних пластикових відходів. Згідно з останніми даними, опублікованими Plastics Europe [9], світове виробництво пластику в 2015 році досягло майже 322 метричних тонн. з річним темпом зростання 8,4%. Усі ці проблеми вказують на серйозну шкоду екосистемі. Біополімери або полімери, отримані з природних джерел, вийшли на ринок як екологічно чисті матеріали, що завдають мінімальної шкоди гармонії, що існує в екосистемі. Більшість біополімерів в даний час знаходять своє застосування в біомедичних сферах, упаковці, текстилі, споживчих товарах, сільському господарстві, автомобілях і транспорті. Один з матеріалів, що використовуються для створення біополімерів, – полігідроксibuтират. Полігідроксibuтирати накопичуються в багатьох мікроорганізмах як сполуки, що накопичують енергію та вуглець, в умовах обмеженого надходження поживних речовин. Ці речовини є біологічно розкладаними полімерами, які можуть замінити полімери, отримані з природних копалин [6].

Матеріали та методи. Аналітичний огляд статей та базової літератури на теми: полігідроксibuтирати, біотехнологічні особливості їх отримання та використання у медицині.

Результати та обговорення. Полігідроксіалканоати (РНА) — це група лінійних поліефірних біополімерів, які виробляються бактеріями під час ферментації цукрів і ліпідів, які накопичуються в клітинах, які є накопичувачами вуглецю та енергії, за умов дефіциту поживних речовин і надлишку джерела вуглецю [8]. РНА було виявлено в *Bacillus megaterium*, які синтезуються та зберігаються як грампозитивними, так і грамнегативними бактеріями у вигляді нерозчинних біополімерів [4]. Полі(3-гидроксibuтират) (РНВ) є гомополімером 3-гидроксibuтирату та найважливішим членом сімейства термопластичних полігідроксіалканоатів, що біологічно розкладаються, з характеристиками високої температури плавлення, високого ступеня кристалічності та низької проникності для O_2 , H_2O та CO_2 .

РНВ є гарною заміною синтетичного полімеру, а його механічні властивості можна порівняти з властивостями поліпропілену. РНВ має характеристики термопластичності та здатності до біологічного розкладання, що привернуло комерційну увагу. РНВ має великий потенціал для упаковки харчових продуктів із кращими властивостями бар'єру для водяної пари, ніж поліпропілен, і кращими властивостями бар'єру для кисню, ніж поліетилентерефталат і поліпропілен [1].

Найважливішим фактором у виробництві РНВ є те, що їх біологічне виробництво з непоповнюваних джерел бактеріальними системами відбувається

як у грампозитивних, так і в грамнегативних бактерій за умови дисбалансу поживних речовин [5].

Біосинтез РНВ мікробами відбувається за рахунок концентрації подвійних молекул ацетил-КоА, що призведе до утворення ацетоацетил-КоА, який у подальшому конденсується до гідроксибутирил-КоА. Цей кінцевий комплекс буде використаний як єдине ціле для синтезу РНВ. Частинки РНА потім вилучаються, порушуючи структуру клітини.

РНА накопичуються рядом типів бактерій під час нестабільних умов росту. Молекулярні структури РНВ діють як енергетичні резервні можливості та встановлюються, коли бактерії перебувають у середовищі, що складається з надлишку вуглецю, і не вистачає будь-яких поживних речовин. РНВ виробляється з бактерій, що утворюють ацетил-КоА, за допомогою дії потрібних ферментів. По-перше, 3-етотіолаза (ген *phbA*) каталізує побудову вуглець-вуглецевого зв'язку шляхом конденсації двох молекул ацетил-КоА. По-друге, ацетоацетил-КоА-редуктаза (НАДФН-залежна) каталізує відновлення ацетоацетил-КоА до R-3-гідроксибутирил КоА. По-третє, фермент РНВ-синтаза каталізує полімеризацію R-3-гідроксибутирил-КоА з утворенням РНВ. Механізм утворення РНВ показано на рисунку 2.

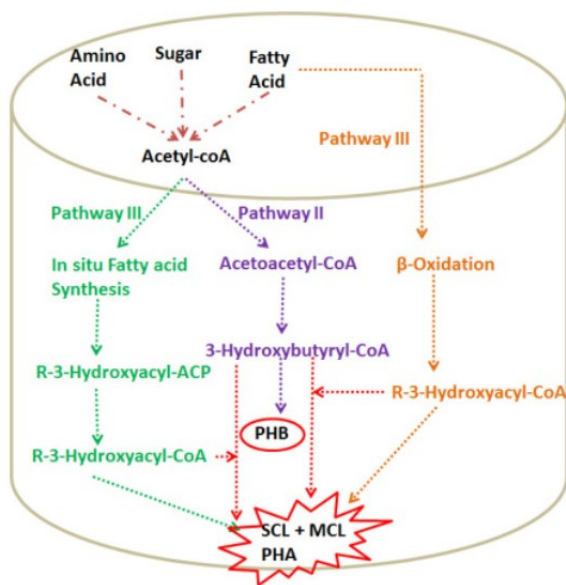


Рис. 1. Механізм утворення РНВ [7].

За допомогою реакції біосинтезу ацетил-КоА утворюється частково кристалоподібний полімер РНВ, подібний до поліпропілену та поліетилену.

Основні властивості РНВ, такі як біосумісність, здатність до біологічного розкладу та багатоцільове використання, позначають його як біологічну допоміжну речовину для штучних полімерів [7].

РНВs мають досить хорошу біосумісність порівняно з багатьма іншими матеріалами, що є достатнім для використання цих біорозкладаних полімерів для виготовлення імплантатів, які контактують з м'якими тканинами, кістками та кров'ю відповідно до стандартів ISO 10993 [2]. Проте порівняння реакції тканин на РНВ і синтетичні полієфіри PLA, PGA або їх кополімери показало, що РНВ викликає або легку, або помірну реакцію тканин. У більшості випадків РНВ та

його кополімери характеризуються хорошою біосумісністю при використанні в якості імплантованих біоматеріалів [3]. Стандартний тест на реакцію тканин на підшкірну імплантацію РНВ та його кополімерів у формі плівки, який використовується в протоколах доклінічних досліджень, виявляє легку або помірну реакцію на сторонній матеріал. Тонка фіброзна капсула (~ 100 мкм) формується протягом місяця і розсмоктується після біодеградації зразків [3].

У багатьох дослідженнях виявлено низьку кількість лімфоцитів або їх фактичну відсутність (зокрема, Т-лімфоцитів) у місці інсерції РНВ, що вказує на те, що імунна реакція на цей полімерний біоматеріал значно знижена або відсутня. Було продемонстровано, що глибоко очищені РНВ також виявляють добру гемосумісність, тому їх можна використовувати для виготовлення кровоcontactних медичних виробів: пластирів для стінки перикарда, легеневої артерії та правого передсердя, а також біорозкладаних коронарних стентів [10]. Проте особливо яскраво біосумісність проявляється при використанні пристроїв на основі РНВ (наприклад, пористих каркасів для регенерації кісткової тканини). Імплантація пристроїв на основі РНВ в ділянку дефекту кісткової тканини не супроводжується утворенням сполучнотканинної капсули, що відокремлює полімерний матеріал від кісткової тканини, що спостерігається для багатьох медичних біоприладів (наприклад, з PLA). Іншими словами, РНВ повністю інтегрується в кісткову тканину.

Завдяки високій біосумісності РНВ є перспективним матеріалом для використання в клітинній біології та клітинній інженерії. Різні клітини ссавців (фібробласти людини та миші, мезенхімальні стовбурові клітини щура, миші та людини, остеобласти кісткової тканини кролика, клітини остеогенної саркоми людини, хондроцити в суглобовому хрящі кролика та клітини гладких м'язів кролика) демонструють хороший рівень клітинної адгезії, проліферації та життєздатності під час культивування *in vitro* на плівках на основі РНВ або пористих каркасах [3]. Нано- та мікрочастинки РНВ та його кополімерів не мають цитотоксичної дії на різні клітини в концентраціях нижче 1 мг/мл [39, 40]; їх ендоцитоз можуть здійснювати не лише макрофаги, а й остеобласти, фібробласти та епітеліальні пухлинні клітини [2]. Водночас цитотоксичність наночастинок PLA і PLGA не була виявлена лише при концентраціях нижче 66–100 мкг/мл, але була сильно виражена при концентраціях вище 100 мкг/мл. Водорозчинні олігомери ПГБ, що складаються з ~ 25 залишків 3-гідроксибутирату, кон'югованих з ліпоїдною кислотою, також не мали *in vitro* цитотоксичної дії на кератиноцити в концентраціях нижче 9 мкг/мл [10].

Висновки. До плюсів цього біоматеріалу можна віднести: нерозчинність у воді та відносна стійкість до гідролітичного розкладання (це відрізняє його від більшості інших доступних в даний час біорозкладних пластиків, які або водорозчинні, або чутливі до вологи, хороша проникність для кисню), хороша стійкість до ультрафіолету, але погана стійкість до кислот та лугів, розчинність у хлороформі та інших хлорованих вуглеводнях, біосумісність і, отже, він підходить для медичного застосування, міцність на розрив 40 МПа, близька до такої у поліпропілену. Ці всі властивості полігідроксибутирату роблять його прекрасним конкурентом на ринку біоматеріалів.

Список використаної літератури:

1. R. A. J. Verlinden et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 102, no. 6. P. 1437–1449. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x> .
2. Z. Luo et al. Biodegradable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2018. Vol. 8, no. 3. P. 1801054. URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.201801054> .
3. A. P. Boskhomdzhev et al. Biodegradation kinetics of poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems . A. P. Boskhomdzhev et al. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010. Vol. 4, no. 2. P. 177–183. URL: <https://doi.org/10.1134/s1990750810020083> .
4. S. Sreedevi, et al. Bioplastics: Advances in Polyhydroxybutyrate Research. *Advances in Polymer Science*. 2014. URL: https://doi.org/10.1007/12_2014_297 .
5. J. M. Luengo et al. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 2003. Vol. 6, no. 3. P. 251–260. URL: [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00040-7) .
6. Du C., Webb C. Cellular Systems. *Comprehensive Biotechnology*. 2011. P. 11–23. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00080-5> .
7. O. Elezi et al. Food Additive Lactic Acid Production by Immobilized Cells of *Lactobacillus brevis* on Delignified Cellulosic Material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51, no. 18. P. 5285–5289. URL: <https://doi.org/10.1021/jf0262211> .
8. E. Grousseau et al. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 148. P. 30–38. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.120> .
9. Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope*. URL: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2016-Plastic-the-facts.pdf> .
10. M. Pontaville et al. Polymer-Based Reconstruction of the Inferior Vena Cava in Rat: Stem Cells or RGD Peptide? M. Pontaville et al. *Tissue Engineering Part A*. 2015. Vol. 21, no. 9-10. P. 1552–1564. URL: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0254> .