

**БИОСОВМЕСТИМОСТЬ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА,  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕМИНОМ**

**BIOCOMPATIBILITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY  
OF FIBROUS MATERIALS BASED ON POLY-3-HYDROXYBUTYRATE  
MODIFIED WITH HEMIN**

*И.А. ВАРЬЯН<sup>1,2</sup>, П.М. ТЮБАЕВА<sup>1,2</sup>*

*I.A. VARYAN<sup>1,2</sup>, P.M. TYUBAEVA<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова,  
<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук)

(<sup>1</sup>Plekhanov Russian University of Economics,  
<sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences)

E-mail: ivetta.varyan@yandex.ru

*Исследовано влияние гемина на структуру и свойства нанокompозитных электроформованных материалов на основе поли-3-гидроксибутирата. Показано, что добавка гемина заметно влияет на морфологию волокон, делая их более прочными. Отмечена также повышенная противомикробная активность. Также рассмотрено влияние гемина на биосовместимость нетканого материала на основе поли-3-гидроксибутирата и перспективы композитов поли-3-гидроксибутират-гемин в качестве материала для заживления ран.*

*The effect of hemin on the structure and properties of nanocomposite electroformed materials based on poly-3-hydroxybutyrate has been studied. It has been shown that the addition of hemin significantly affects the morphology of the fibers, making them stronger. An increased antimicrobial activity was also noted. The influence of hemin on the biocompatibility of a nonwoven material based on poly-3-hydroxybutyrate and the prospects of poly-3-hydroxybutyrate-hemin composites as a material for wound healing are also considered.*

**Ключевые слова:** поли-3-гидроксибутират, гемин, биосовместимость, антимикробная активность.

**Keywords:** poly-3-hydroxybutyrate, hemin, biocompatibility, antimicrobial activity.

Биомедицинские материалы имеют большое значение в различных областях медицины, включая создание имплантатов, тканевую инженерию, диагностику заболеваний и многое другое. При этом наиболее востребованным на данный момент направлением исследований в области биомедицинских материалов является раз-

работка инновационных полимерных материалов на основе возобновляемых ресурсов [1, 2]. Так, например, большое внимание уделяется полигидроксиалканоатам (ПГА) – классу устойчивых алифатических полиэфиров, продуцируемых различными микроорганизмами.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ МК-1651.2022.1.3.

Наиболее популярным биополимером среди всех ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). Это биосовместимый, термопластичный полимер, который образуется, хранится и разлагается в результате жизнедеятельности микроорганизмов [3]. В увлажненном компосте ПГБ подвергается быстрой биодеградации [4, 5]. Благодаря высокой биосовместимости ПГБ имеет широкий спектр применения, включая биомедицину, тканевую инженерию, средства доставки лекарств, материалы для заживления ран [6-8] и другие приложения.

Однако несмотря на все вышеперечисленные преимущества низкие механические свойства по-прежнему ограничивают широкое коммерческое использование ПГБ [9]. Для решения этой проблемы предприняты попытки модификации ПГБ путем введения в него различных добавок природного происхождения [10-13]. При этом одной из активно используемых добавок являются порфирины [14-16]. Добавки на основе порфиринов биосовместимы, химически и термически стабильны. Кроме того, такие добавки обладают высокой антимикробной и противовирусной активностью [17].

В настоящей работе изучено влияние модифицирующей добавки на основе природных порфиринов, такой, как гемин, на биосовместимость и антимикробную активность материалов на основе ПГБ, полученных методом электроформования. Ранее гемин уже применялся в различных биомедицинских материалах в качестве фрагмента, способствующего связыванию белка с полимером, контейнера для биоактивных молекул и биокатализатора [18]. Также в наших предыдущих работах описан характер влияния гемина на надмолекулярную структуру образования ПГБ.

#### *Материалы и методы*

В качестве исследуемого образца использовали ПГБ в виде мелкодисперсного порошка (серия 16F, BIOMER, Германия). Структурная формула ПГБ показана на рис. 1, а. Содержание кристаллической фазы в исследуемом ПГБ составляло 59 %, молекулярная масса 206 кДа, плотность

1,248 г/см<sup>3</sup>. В качестве модифицирующей добавки использовали гемин (рис. 1, б), полученный методом экстракции из бычьей крови (Aldrich-Sigma, США). Для получения волокнистых материалов на основе композита ПГБ-гемин методом электроформования использовалась однокапиллярная установка ЭФВ-1 (Москва, Россия). Для приготовления формовочных растворов порошок ПГБ растворяли в хлороформе при температуре 60 °С, а порошок гемина – в N,N-диметилформамиде при температуре 25 °С. Оба раствора гомогенизировали и использовали через 12 часов после изготовления.

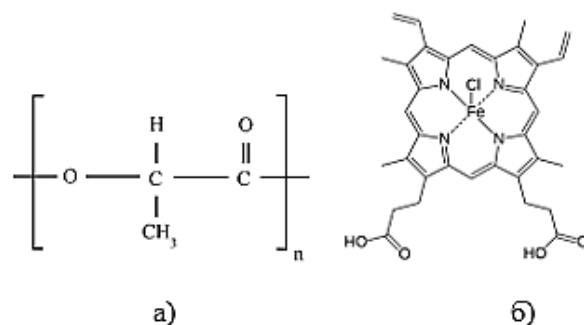


Рис. 1

Полученные волокнистые материалы исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Tescan VEGA3 (Брно, Чехия). Анализ механических свойств проводили на разрывной машине Devotrans DVT GP UG 5 (Стамбул, Турция) на образцах размером 10-40 мм при скорости растяжения 25 мм/мин без предварительного натяга. Степень кристалличности и средние размеры кристаллитов определяли методом рентгеноструктурного анализа на дифрактометре HZG4 (Freiburger Präzisionsmechanik, Германия). Термические свойства исследовались с помощью дифференциального сканирующего калориметра Netzsch 214 Polyma (Германия) в атмосфере аргона со скоростью нагрева 10 °К/мин и скоростью охлаждения 10 °К/мин при массе образцов 6-7 мг. Антимикробную активность определяли медико-биологическими тестами. Для культур микроорганизмов использовали мясопептонный агар, время инкубации 24 ч при 37°С. Концентрация микробных клеток в

физиологическом растворе составляла 104 мк/мл. Посевы инкубировали в течение 48 ч при 37 °С после приготовления образцов. Иммутированную клеточную линию фибробластов человека VJ-5ta поддерживали в полистироловых колбах объемом 25 см<sup>2</sup> в среде DMEM с добавлением 10 % FBS и гентамицина (50 мкг/мл) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали с использованием раствора трипсин-ЭДТА два раза в неделю. Для оценки цитотоксической активности и биосовместимости клетки высеивали в 24-луночные планшеты (по 20 000 клеток на лунку) непосредственно перед экспериментом на пленочных образцах и инкубировали в стандартных условиях в течение 72 ч. Для оценки выживаемости клеток применяли стандартный МТТ-тест.

#### Результаты и обсуждение

СЭМ-изображения электроформованных материалов на основе композитов ПГБ-гемин показаны на рис. 2. Как видно, добавление гемина способствовало изменению поверхности волокон ПГБ. Все волокна ПГБ-гемин имели однородную структуру. С увеличением концентрации гемина количество дефектов на поверхности волокон заметно уменьшалось. Так, утолщения и склеивания волокон полностью исчезали при содержании гемина 5 %. При этом поверхностная плотность снижалась на 30-40 %, а средний диаметр волокон уменьшался на 40-50 %. Формирование более однородных по составу волокон способствовало повышению их прочности. Для образцов с содержанием гемина на уровне 5 % показатель прочности при растяжении увеличивался в 3,2 раза, в то время как относительное удлинение при разрыве увеличивалось в 1,7 раза. Отметим, что увеличение содержания гемина до значений более 5 % приводило к некоторому ухудшению механических свойств композитов ПГБ-гемин.

По данным рентгеноструктурного анализа введение гемина существенно влияло на степень кристалличности и размер волокон ПГБ. Как видно на рис. 3, введение гемина привело к уменьшению доли кристаллической фазы на 6-15 %. При этом

размер кристаллитов увеличился на 15-26 %. Эти результаты согласуются с изменениями термических свойств композитов ПГБ-гемин. Так, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии гемин мало влияет на температуру плавления кристаллической фазы: при первой плавке она уменьшилась лишь на 12-19 %, а при второй – на 13-20 %. Такая незначительная разница свидетельствует о том, что полимер успевает кристаллизоваться и волокнистая структура мало влияет на фазовое распределение в формовочном растворе [20].

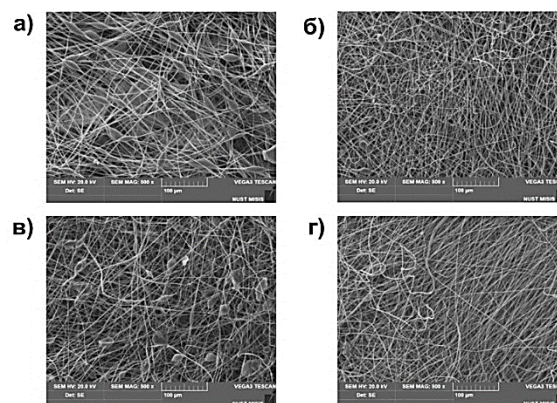


Рис. 2

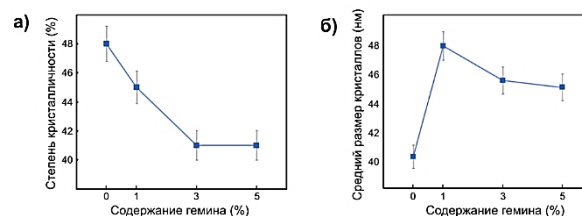


Рис. 3

Для оценки биосовместимости полимерных материалов исследованы антимикробная активность и токсичность композитов ПГБ-гемин. Как известно, чистый ПГБ не обладает антибактериальной активностью. Однако, как видно из табл. 1, введение гемина приводило к возникновению у композита антимикробной активности. Так, для образцов с содержанием гемина 1 % наблюдалось снижение КОЕ для *S. aureus* на 47 %, а для *E. coli* на 90 %. Для *S. typhimurium* присутствие гемина было менее эффективным, снижая КОЕ лишь на 15 %. Еще большей антибактериальной

активностью обладали образцы с содержанием гемина 3 и 5 %. Так, например, снижение КОЕ для *S. aureus* и *S. typhimurium* составляло 79-89 % и 74-75 % соответственно. Для *E. coli* этот показатель достигал 98 %.

Т а б л и ц а 1

Тестовая культура	Исходная культура, КОЕ/мл	Проба, КОЕ/мл	Контроль, КОЕ/мл
<i>S. aureus</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^3$	$8.6 \cdot 10^3$
<i>E. coli</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$8.5 \cdot 10^2$	$9.8 \cdot 10^3$
<i>S. typhimurium</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$7.2 \cdot 10^3$	$8.1 \cdot 10^3$
	ПГБ-гемин (3 %)		
<i>S. aureus</i>	$2.1 \cdot 10^4$	$1.8 \cdot 10^3$	$8.6 \cdot 10^3$
<i>E. coli</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$< 1 \cdot 10^2$	$9.8 \cdot 10^3$
<i>S. typhimurium</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^3$	$8.1 \cdot 10^3$
	ПГБ-гемин (5 %)		
<i>S. aureus</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$0.9 \cdot 10^3$	$8.6 \cdot 10^3$
<i>E. coli</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$< 1 \cdot 10^2$	$9.8 \cdot 10^3$
<i>S. typhimurium</i>	$2.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^3$	$8.1 \cdot 10^3$

Оценку цитотоксического действия композитов ПГБ-гемин проводили на основании результатов МТТ-теста. По результатам 24-, 48- и 72-часовой инкубации клеток ВJ-5ta с композитом ПГБ-гемин с различным содержанием гемина не было выявлено существенных различий в морфологии, форме клеток, адгезии или выживаемости. Таким образом, отсутствие разрывов, деформаций и других явлений подтверждает хорошую биосовместимость исследованных образцов и отсутствие токсического действия композита на жизнеспособность и морфологию клеток.

## ВЫВОДЫ

Изучено влияние введения добавки гемина на механические свойства, биосовместимость и антимикробную активность ПГБ. Показано, что присутствие гемина в количестве 1-5 % позволяет получать волокна с улучшенной морфологией. В частности, для композитов с содержанием гемина 5 % предел прочности при растяжении увеличился в 3,2 раза, а относительное удлинение при разрыве увеличилось в 1,7 раза. Также произошли изменения в кристаллической структуре полимера: увеличился размер кристаллитов ПГБ и уменьшилась

их общая доля. Исследования антибактериальной активности показали, что введение добавки гемина с массовой долей в 5% в матрицу ПГБ привело к снижению КОЕ для *S. aureus* и *S. typhimurium* на 79-89 % и 74-75 % соответственно. Для *E. coli* этот показатель достигал 98 %. Результаты исследования цитотоксической активности показали, что волокна на основе ПГБ обладают высокой безопасностью и могут быть перспективными носителями для применения в регенеративной медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arif U., Haider S., Haider A., Khan N., Alghyamah A.A., Jamila N., Khan M.I., Almasry W.A., Kang I.K. Biocompatible Polymers and their Potential Biomedical Applications: A Review. *Curr Pharm Des.* 2019, 25(34), 3608-3619. – DOI: 10.2174/1381612825999191011105148
2. Li M., Wilkins M.R. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 156, 691-703. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082
3. Kushwah B.S., Kushwah A.V.S., Singh V. Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use. *J Polym Res* 2016, 23(8), 153. – DOI: 10.1007/s10965-016-0988-3
4. Zhao J., Weng G., Li J., Zhu J., Zhao J. Polyester-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 92, 983-994. – DOI: 10.1016/j.msec.2018.07.027
5. Singh G., Kumari A., Mittal A., Yadav A., Aggarwal N.K. Polyβ-Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *BioMed Res. Int.* 2013, 1-10 – DOI: 10.1155/2013/952641
6. Kai D., Loh X.J. Polyhydroxyalkanoates: Chemical Modifications Toward Biomedical Applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014, 2, 106-119. – DOI: 10.1021/sc400340p
7. Bakhtiari S.S.E., Karbasi S., Toloue E.B. Modified Poly(3-hydroxybutyrate)-based scaffolds in tissue engineering applications: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 166, 986-988. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.255
8. Chen G., Wang Y. Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *CHINESE J POLYM SCI* 2013, 31(5), 719-736. – DOI: 10.1007/s10118-013-1280-1
9. Yeo J.C.C., Muiruri J.K., Thitsartarn W., Li Z., He C. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 92, 1092-1116. – DOI: 10.1016/j.msec.2017.11.006

10. Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Priji P., Josh M.S., Benjamin S. Bioplastics: Advances in Polyhydroxybutyrate Research. *Adv Polym Sci.* 2014. – DOI: 10.1007/12\_2014\_297
11. Arrieta M.P., López J., Hernández A., Rayón E. Ternary PLA–PHB–Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *Eur. Polym. J.* 2014, 50, 255-270. – DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.11.009
12. Kumara B.P., Maruthi Y.P. et. al. Development and characterization of polycaprolactone (PCL)/poly ((R)-3-hydroxybutyric acid) (PHB) blend microspheres for tamoxifen drug release studies. *Int. J. of Pharm. and Pharmac. Sci.* 2015, 7(9), 95-100
13. Karimi A., Karbasi S., Razavi S., Zargar E.N. Poly(hydroxybutyrate)/chitosan Aligned Electrospun Scaffold as a Novel Substrate for Nerve Tissue Engineering. *Adv Biomed Res.* 2018, 7(44). – DOI: 10.4103 /abr.abr\_277\_16
14. Wu J., Li S., Wei H. Integrated nanozymes: facile preparation and biomedical applications. *ChemComm*, 2018, 54(50), 6520-6530. – DOI: 10.1039/c8cc01202d
15. Imran M., Ramzan M., Qureshi A., Khan M., Tariq M. Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. *Biosensors* 2018, 8(4), 95. – DOI: 10.3390/bios8040095
16. Waghorn P.A. Radiolabelled porphyrins in nuclear medicine. *J Labelled Comp Radiopharm* 2014, 57(4), 304-309. – DOI: 10.1002/jlcr.3166
17. Zhu Y., Chen J., Kaskel S. Porphyrin-Based Metal-Organic Frameworks for Biomedical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 60(10). – DOI: 10.1002/anie.201909880
18. Lu Y., Berry S.M., Pfister T.D. Engineering novel metalloproteins: design of metal-binding sites into native protein scaffolds. *Chem. Rev.* 2001, 101(10), 3047-3080. – DOI: 10.1021/cr0000574
19. Tyubaeva P., Varyan I., Lobanov A., Olkhov A., Popov A. Effect of the Hemin Molecular Complexes on the Structure and Properties of the Composite Electrospun Materials Based on Poly(3-hydroxybutyrate). *Polymers*, 2021, 13(22), 4024. – DOI: 10.3390/polym 13224024
20. Yeo J.C.C., Muiruri J.K., Thitsartarn W., Li Z., He C. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 92, 1092-1116. – DOI: 10.1016/j.msec.2017.11.006

Рекомендована оргкомитетом XIX Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы». Поступила 16.10.23.