

**СТРУКТУРА И ТРАНСПОРТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЛОКНИСТЫХ МАТРИЦ  
НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА С ДИПИРИДАМОЛОМ**

**STRUCTURE AND TRANSPORT CHARACTERISTICS OF FIBROUS MATRICES  
BASED ON POLYHYDROXIBUTIRATE WITH DIPYRIDAMOL**

А.А. Ольхов<sup>1,2,3</sup>, Е.Л. Кучеренко<sup>2</sup>, О.В. Староверова<sup>2</sup>,  
Р.Ю. Косенко<sup>2</sup>, В.С. Маркин<sup>2</sup>, Ю.Н. Зернова<sup>2</sup>, А.Л. Иорданский<sup>2</sup>  
А.А. Olkhov<sup>1,2,3</sup>, E.L. Kucherenko<sup>2</sup>, O.V. Staroverova<sup>2</sup>,  
R.Yu. Kosenko<sup>2</sup>, V.S. Markin<sup>2</sup>, Yu.N Zernova<sup>2</sup>, A.L. Iordanskii<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский экономический университет  
им. Г. В. Плеханова; (Москва)

<sup>2</sup>Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, (Москва)

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук, (Москва)

E-mail: aolkhov72@yandex.ru

<sup>1</sup>Plekhanov Russian University of Economics, (Moscow)

<sup>2</sup>Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, (Moscow)

<sup>3</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, (Moscow)

E-mail: aolkhov72@yandex.ru

В статье изучена надмолекулярная структура и транспортные характеристики нетканых волокнистых матриц пролонгированного высвобождения лекарственных веществ на основе ультратонких волокон полигидроксибутирата, полученных методом электроформования. В качестве лекарственного вещества был использован дипиридамо́л в концентрациях 1 - 5%. Структурно-динамическими методами: СЭМ, ДСК, ЭПР была исследована надмолекулярная структура материалов. Было установлено изменение геометрии волокон при добавлении дипиридамо́ла. При добавлении дипиридамо́ла в волокнах происходит дополнительная кристаллизация полимера, а также происходит уплотнение аморфных областей полигидроксибутирата.

**Ключевые слова:** полигидроксибутират, дипиридамо́л, транспортные свойства, ультратонкие волокна, электроформование, надмолекулярная структура.

The article studies the supramolecular structure and transport characteristics of nonwoven fibrous matrices for the sustained release of drugs based on ultrafine polyhydroxybutyrate fibers obtained by electrospinning. Dipyridamole in concentrations of 1-5% was used as a medicinal substance. Structurally dynamic methods: SEM, DSC, EPR, the supramolecular structure of materials was investigated. A change in fiber geometry with the addition of dipyridamole was found. When dipyridamole is added in the fibers, additional polymer crystallization occurs, and the amorphous regions of polyhydroxybutyrate also become denser.

**Key words:** polyhydroxybutyrate, dipyridamole, transport properties, ultrafine fibers, electrospinning, supramolecular structure.

Создание эффективных и биосовместимых матриц для адресной и программируемой доставки лекарственных веществ в живой организм является актуальной задачей современной биологии и медицины [1]. Подобные изделия получают на основе природных и синтетических биополимеров. Эти изделия представляют собой пленки, микро- и наночастицы или капсулы, ультратонкие волокна, где физически инкапсулировано или химически иммобилизовано лекарственное вещество (ЛВ) [2-5].

Наиболее часто для изготовления биосовместимых и биорезорбируемых матриц применяют полигидроксибутират (ПГБ), являющийся ярким представителем класса бактериальных полиэфиров - полиоксиалканоатов. Он обладает наиболее высокой

биосовместимостью с живым организмом, регулируемым периодом биodeградации (биорезорбции) и достаточно высоким уровнем физико-механических характеристик пленок и волокон. ПГБ [6-8].

Целью настоящей работы являлось исследование структуры ультратонких волокон полигидроксibuтирата и кинетики высвобождения ДПД.

### Объекты и методы исследования

Для получения исследуемых волокон в работе использовали природный биоразлагаемый полимер полигидроксibuтират серии 16F, полученный методом микробиологического синтеза компанией BIOMER® (Германия). Исходный полимер представляет собой белый мелкодисперсный порошок с размером частиц 5-20 мкм. Средневязкостная молекулярная масса  $4.6 \cdot 10^5$  г/моль. В качестве модельного лекарственного вещества для контролируемого высвобождения использовали дипиридамола (2,2',2'',2'''-[(4,8-Ди-1-пиперидинилпиримидо[5,4-d]пиримидин-2,6-диил)динитрило]тетракис[этанол]). Структурная формула ДПД представлена на рис. 1.

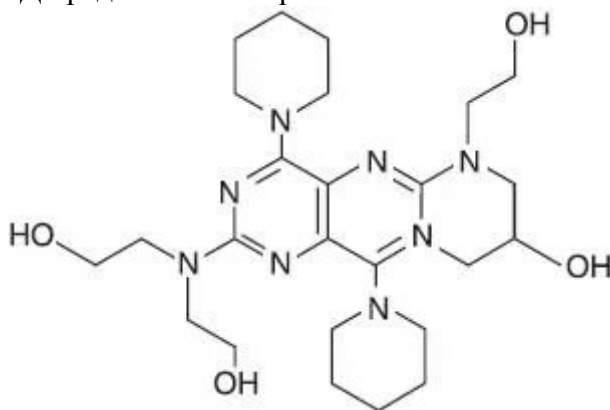


Рис. 1. Структурная формула дипиридамола.

Фармакологическая группа, к которой относится дипиридамола (ДПД): антиагреганты, ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции, аденозинергические средства. Молекулярная масса ДПД составляет 504,53 г/моль.

Ультратонкие волокна ПГБ получали методом электроформования (ЭФ) [9]. Для получения волокон готовили формовочные растворы: ПГБ и ПГБ с ДПД в хлороформе. Концентрация ПГБ в растворе составляла 7% масс. Содержание дипиридамола в композиции с полимером составляло: 1; 3; 5% масс., относительно массы ПГБ. Формовочные растворы ПГБ с ДПД готовили при 50 °С с помощью автоматической магнитной мешалки с подогревом и ультразвуковой ванны.

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) (X-диапазона) регистрировались на автоматизированном ЭПР спектрометре ЭПР-В (ИХФ РАН, Москва). В качестве зонда использовали стабильный нитроксильный радикал 2,2,6,6-тетрамethylпиперидин-1-оксил (ТЕМПО). Радикал вводили в волокна из паров при температуре 50<sup>0</sup> С. Концентрации радикала в полимере не превышала 10<sup>-3</sup> моль/л.

Исследование образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) было проведено на приборе DSC 204 F1 фирмы Netzsch в инертной среде аргона (Ar) со скоростью нагрева 10°С/мин. Среднестатистическая ошибка измерения тепловых эффектов составляла ±3%. Энтальпия плавления была рассчитана по программе NETZSCH Proteus.

Геометрию волокнистых материалов исследовали методом электронной микроскопии с помощью сканирующего электронного микроскопа “Hitachi TM-1000” (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кV. На поверхность образца нетканого волокнистого материала напыляли слой золота толщиной 100-200 Å.

Поскольку вводимое ЛВ может оказывать влияние на формирование надмолекулярной структуры волокна, мы исследовали геометрические параметры, структуру кристаллических и аморфных областей ПГБ волокон в зависимости от содержания ДПД.

При изучении морфологии нетканых волокнистых материалов методом СЭМ, наблюдаются изменение геометрии волокон при добавлении ДПД.

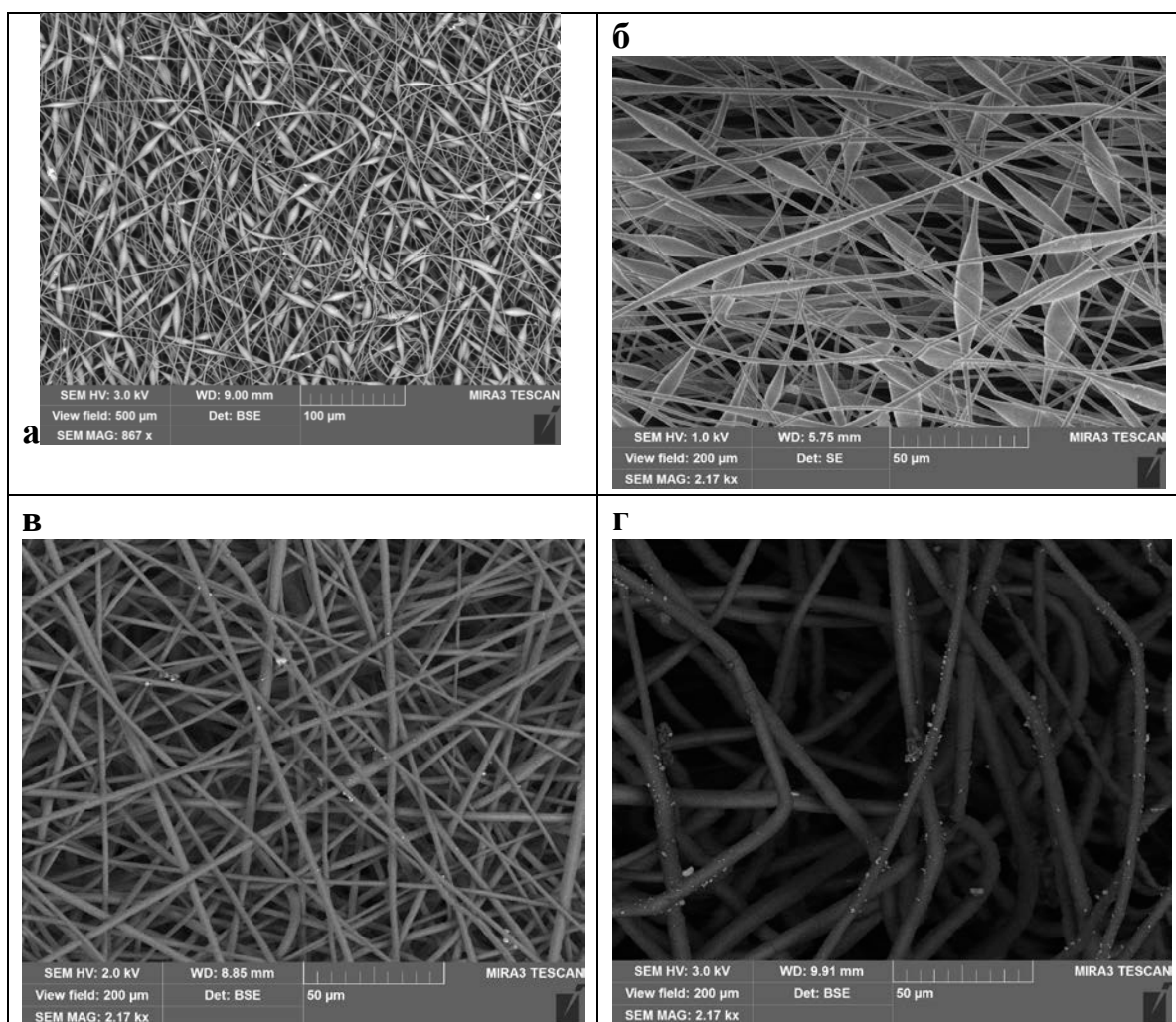


Рис.2. Микрофотографии волокнистых материалов состава: исходный ПГБ (а), ПГБ + 1% ДПД (б), ПГБ + 3% ДПД (в), ПГБ + 5% ДПД (г).

На рис.2 представлены микрофотографии волокнистых материалов ПГБ с различным содержанием ДПД. Как видно из этого рисунка, у волокон ПГБ наблюдается значительное число веретеноподобных утолщений, содержание которых снижается с ростом концентрации ДПД и совершенно не наблюдается у волокон с 5% ДПД.

В процессе электроформования наиболее частой причиной возникновения утолщений на цилиндрических волокнах ПГБ является нарушение стационарного режима истечения полимерного раствора (биения, пульсации и т.п.), которое может быть связано с малой электропроводностью или неоптимальной вязкостью формовочного раствора. Как видно на рис.2(в), при добавлении в полимерный раствор 3% ДПД на волокнах наблюдается лишь незначительное количество утолщений. При этом средний диаметр веретеноподобных элементов несколько снижается и составляет от 5 до 7 мкм. Длина этих утолщений составляет от 15 до 20 мкм. Дальнейшее увеличение концентрации ДПД в формовочном растворе (до 5%) приводит к полному исчезновению утолщений на волокнах, см. рис.2 (г)

Следует отметить, что при концентрации ДПД 5%, на поверхности волокна появляются дисперсные частицы произвольной формы размером до 1 мкм и их агломераты. Исчезновение этих частиц после кратковременной экспозиции в воде позволяет считать, что наблюдаемые частицы образованы кристаллами ДПД в результате быстрой десорбции растворителя и формирования твердого волокна. Как свидетельствуют микрофотографии (рис. 2 б, в), при более низких концентрациях ДПД от 1 до 3% отдельная фаза последнего на поверхности волокна не образуется.

При изучении термограмм нагревания волокон ПГБ с различным содержанием ДПД видно, что при первичном нагреве на кинетической кривой появляется достаточно протяженное «плечо» в низкотемпературной области. Оно свидетельствует о наличии в волокне кристаллитов ПГБ, имеющих малые размеры или дефекты. Это свидетельствует о неравновесном состоянии надмолекулярной структуры. При повторном нагреве материала мы отчетливо видим бимодальное распределение кристаллической фазы по температуре плавления (пунктирная кривая). При этом пики плавления смещаются в низкотемпературную область.

Данное заключение подтверждается экспериментом по высокотемпературному отжигу материалов при температуре 140 °С, близкой к началу плавления ПГБ, в течение 2 часов. После отжига все бимодальные пики плавления сдвигаются в область более низких температур с одновременным увеличением степень кристалличности полимера, см. таб.

Таблица 1

Энтальпия ( $\Delta H$ ) и температура плавления ( $T_{пл}$ ) ультратонких волокон смесей ПГБ с ДПД.

Парамет-ры	ПГБ	ПГБ+1% ДПД	ПГБ+3% ДПД	ПГБ+5% ДПД
$\Delta H$ Дж/г, 1 нагрев	43	54	72	80
$T_{пл}$ , °С, 1 нагрев	169	168	167; 169	169
Отжиг при 140 °С (2 часа)				
$\Delta H$ Дж/г, 1 нагрев	92	96	67	90
$T_{пл}$ , °С, 1 нагрев	169	170	166	165

Из данных таб. следует, что энтальпия плавления волокон ПГБ после отжига возрастает. Термическая обработка переводит кристаллическую фазу ультратонких волокон в более равновесное состояние, характеризующееся более высокой степенью кристалличности (~70 %).

По мере возрастания концентрации ДПД в волокне ПГБ, его надмолекулярная структура становится более совершенной и равновесной с увеличенной степенью кристалличности. Аналогичная тенденция наблюдается и при отжиге образцов волокон при любом содержании ДПД. Поскольку отжиг способствует снятию внутренних напряжений в полимере и тем самым росту кристалличности за счет прилегающих к кристаллам проходных цепей.

Структуру и молекулярную динамику межкристаллических аморфных областей можно эффективно исследовать методом ЭПР с использованием стабильных радикалов в качестве зондов вращения.

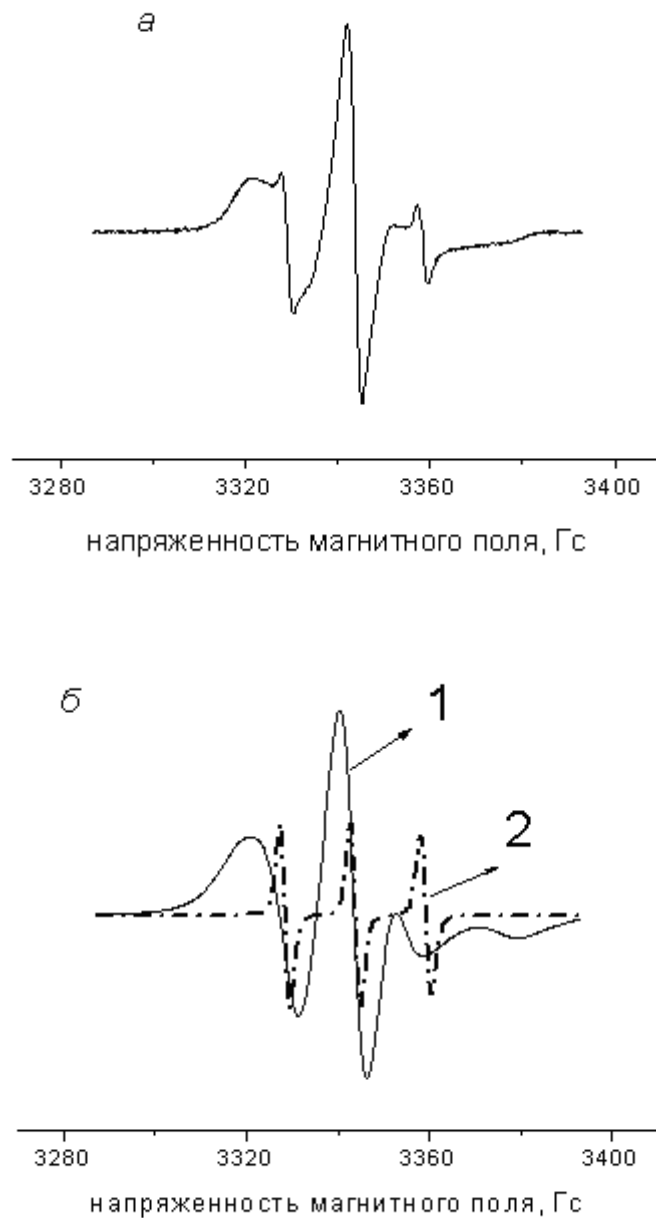


Рис. 3. Спектры ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО в ПГБ с 1% ДПД (а) и после разложения на медленную (1) и быструю (2) составляющие (б).

Как видно на рис. 3, ЭПР спектры радикала ТЕМПО в волокнах ПГБ имеют сложный вид (рис. 3а) и представляют суперпозицию двух более простых спектров (рис. 3б), которые соответствуют двум популяциям радикалов с различающимися временами корреляции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , где  $\tau_1$  характеризует быструю молекулярную подвижность в менее плотных, а  $\tau_2$  - медленную подвижность в более плотных межкристаллитных областях.

На рис. 4. представлены зависимости времени корреляции (вращения зонда) от содержания ДПД (а) и от времени отжига волокнистых материалов при различном содержании ДПД (б).

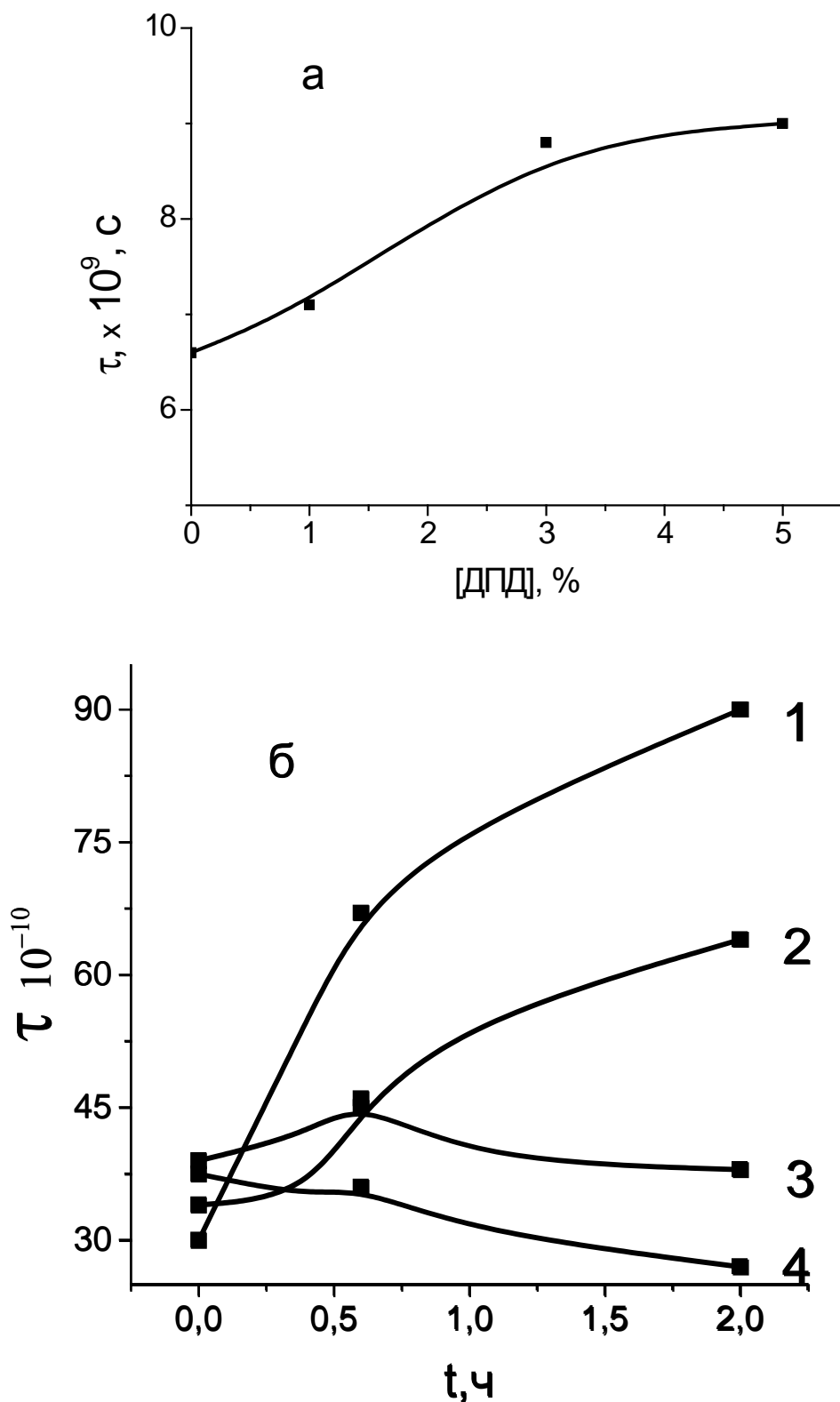


Рис. 4. Зависимость времени корреляции от концентрации ДПД (а) и времени отжига при 140 °С волокон ПГБ при различной концентрации ДПД: исходная (1), 1(2), 3(3) и 5 % масс. (4).

Снижение скорости вращения зонда (рост медленной составляющей -  $\tau_2$ ) радикала с увеличением концентрации ДПД и времени отжига говорит нам о том, что в волокнах ПГБ растет степень кристалличности и одновременно происходит уплотнение участков

макромолекул ПГБ в аморфных межкристаллитных областях (снижается подвижность сегментов макромолекул).

Проведенный режим отжига в наибольшей степени воздействует на сегментальную динамику волокон ПГБ с низким содержанием ДПД (0 и 1%), а с увеличением концентрации ДПД этот эффект проявляется менее заметно. Все результаты, включающие влияние концентрации ДПД на геометрические параметры волокон, их структурно-динамические характеристики, несомненно, должны коррелировать с кинетическими параметрами диффузионно-транспортных процессов ДПД в модельных средах

Кинетические профили высвобождения характеризуются начальным нелинейным во времени участком и завершающим участком, где концентрация десорбируемого из пленок ДПД возрастает линейно. Для всех кинетических профилей выхода лекарства из волокон ПГБ-ДПД наблюдается суперпозиция двух процессов, а именно, как мы выяснили, представляют собой комбинацию диффузионной и кинетической составляющей.

На вставке рис. 5 показаны линейные участки кинетических кривых в диффузионных координатах (относительная концентрация – корень из времени) и видно, что тангенсы углов наклона с ростом содержания лекарственного вещества в системе уменьшаются. Вероятно, ДПД оказывает стабилизирующее действие на структуру волокна. Как нами было установлено ранее, с ростом ДПД происходит дополнительная кристаллизация ПГБ в волокнах, т.е. внутренние напряжения снижаются и структура приходит в состояние равновесия.

Компьютерное вычитание значений концентрации высвободившегося ДПД из общей концентрации ДПД, в каждый данный момент времени  $t$  позволяет построить зависимость  $(D_t - \text{tgt} * t) / D_\infty \sim t^{1/2}$ . Данные представлены на рис.5.

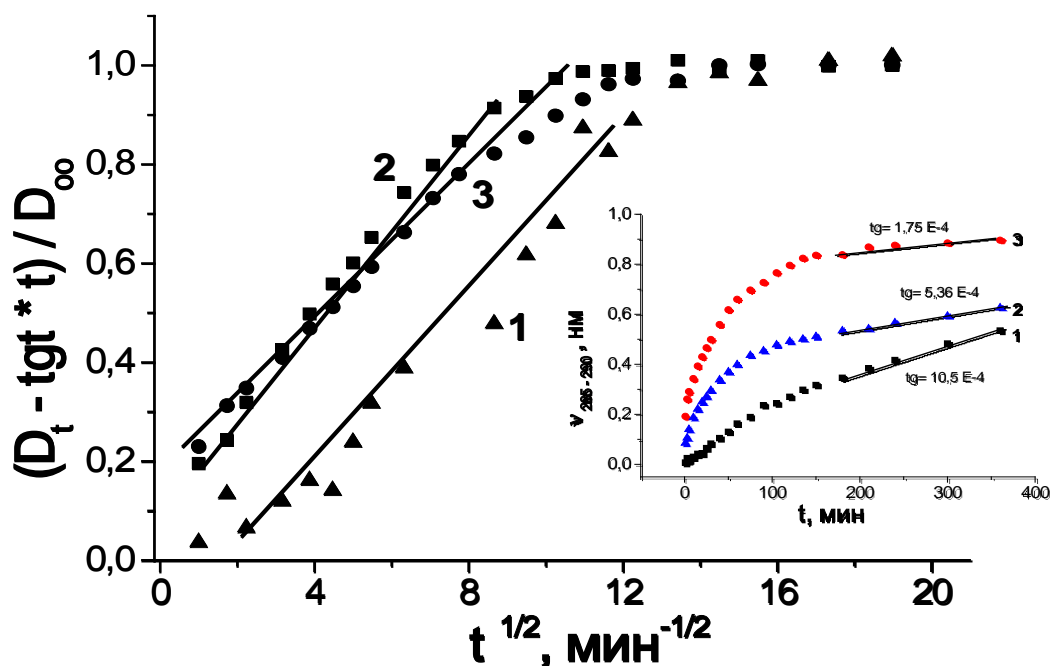


Рис. 5. Зависимость количества высвобождающегося ДПД от времени при различном составе волокон: 1 - 1%, 2 – 3%, 3 – 5% ДПД (в диффузионных координатах). Вставка: Зависимость оптической плотности при 295-290 нм ( $v$ , нм) раствора ДПД, высвободившегося из волокон ПГБ, содержащих ДПД: 1% (1), 3% (2), 5% (3).

Все кинетические кривые, полученные для волокнистых материалов ПГБ с различным содержанием ДПД, имеют монотонный характер с явно выраженным пределом. Внешний

вид этих кривых соответствует классическим десорбционным кривым, где механизм транспорта определяется диффузией низкомолекулярного вещества (ДПД). На вставке рис. 6 проведены прямые линии на зависимостях оптической плотности раствора ДПД, высвободившегося из волокон ПГБ, по которым были определены тангенсы углов наклона прямых участков. Тангенс прямолинейных участков, построенных в координатах диффузии (рис. 7), описывают только кинетический вклад в механизм высвобождения ДПД, и позволяет рассчитать коэффициенты диффузии последнего в волокнистых материалах ПГБ.

Графическое решение позволяет рассчитать эффективные коэффициенты диффузии ДПД в волокнах ПГБ. Для этого в координатах  $(D_t - \text{tg}t * t) / D_\infty \sim t^{1/2}$ , мы численно определили положительные тангенсы наклона  $(\text{tg}\alpha)$ , а затем по уравнению  $D_{\text{дпд}} = \pi * L^2 (\text{tg}\alpha)^2 / 16$  провели соответствующий расчет. Таким образом, нелинейный участок кинетического профиля высвобождения ДПД определяется процессом диффузии. Резкое изменение значений коэффициента диффузии соответствует структурному переходу от геометрии чередующихся цилиндрических и веретеноподобных участков волокна к полностью цилиндрическим, что иллюстрируется микрофотографиями, представленными на рис.2.

Проявление двух процессов высвобождения (диффузионного и кинетического) позволяет предположить, что ДПД существует в волокнах ПГБ в двух формах: связанной (в объеме) и свободной (на поверхности). Следует отметить, что только свободная форма ДПД способна к быстрой десорбции с поверхности волокон ПГБ по диффузионному механизму. Поэтому кинетические кривые высвобождения в начальный момент времени имеют скачок. Другая форма ДПД, находящаяся в объеме полимера в иммобилизованном состоянии, имеет сравнительно низкую диффузионную подвижность. Ее десорбция из объема полимерного волокна обеспечивается частичной деградацией (гидролизом) ПГБ (потерей массы с включенной в нее иммобилизованной формой ДПД) по уравнению нулевого порядка [10, 11].

Методом электроформования получены ультратонкие волокна биodeградируемого ПГБ, содержащие различные концентрации лекарственного вещества - дипиридамола. Установлено, что при отсутствии и низком содержании ДПД (до 1%) волокна представляют собой чередование а) цилиндрических фрагментов с диаметром 1-3 мкм, и б) веретеноподобных утолщений со средним диаметром 5-7 мкм. С ростом концентрации ДПД от 3 до 5% волокна характеризуются только цилиндрической геометрией. Структурно динамическими методами определено, что волокна обладают неравновесной структурой и с ростом концентрации ДПД происходит дополнительной кристаллизация ПГБ, что способствует уплотнению аморфных областей ультратонких волокон. Отжиг волокон ПГБ приводит к дополнительному росту кристалличности полимера и снижению сегментальной подвижности в межкристаллических областях полимера. Определено, что высвобождение LGL протекает по диффузионному механизму с искажением профиля за счет геометрической и структурной неоднородности волокна. Результаты настоящего исследования позволят проектировать биополимерные терапевтические системы для направленного и пролонгированного транспорта биоактивных соединений и лекарственных веществ в живой организм.

Работа выполнена в лаборатории «Диффузионных явлений в полимерных системах» №0313 ФИЦ ХФ РАН (тема № АААА-А17-117040610309-0). Измерения проводились с помощью оборудования ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. McClements D.J. // Adv. Colloid Int. Sci. 2015. V. 219. № 1. P. 27.
2. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery / Ed. by J. Siepmann, R.A. Siegel, M.J. Rathbone. London; New York, Dodrecht, Heidelberg: Springer 2012.- 594 p.
3. Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A. Polymers for Drug Delivery Systems // Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2010. V.1. P. 149–173.



4. Kamaly N., Yameen B., Wu J., Farokhzad O.C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release // *Chem. Rev.* 2016. V. 116. №4. P. 2602–2663.
5. Xu H., Li H., Chang J. Controlled drug release from a polymer matrix by patterned electrospun nanofibers with controllable hydrophobicity // *J. Mater. Chem. B.* 2013. V. 1. P. 4182-4188.
6. Kampeerapappun P. The electrospun polyhydroxybutyrate fibers reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology and properties // *J. Appl. Polym. Sci.* 2016. V. 133. P. 43273. DOI: 10.1002/app.43273.
7. Bellani C.F., Pollet E., Hebraud A., Pereira F.V., Schlatter G., Avérous L., Bretas R.E.S., Branciforti M.C. Morphological, thermal, and mechanical properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly( $\epsilon$ -caprolactone)-grafted-cellulose nanocrystals mats produced by electrospinning // *J. Appl. Polym. Sci.* 2016. V. 133. P. 43445. DOI: 10.1002/app.43445.
8. Tănase E.E., Popa M.E., Râpă M., Popa O. PHB/Cellulose Fibers Based Materials: Physical, Mechanical and Barrier Properties // *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* 2015. V. 6. P. 608-615.
9. Филатов Ю. Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс). М.: Нефть и Газ, 1997. - 297 с.
10. Ольхов А.А., Маркин В.С., Косенко Р.Ю., Гольдштрах М.А., Иорданский А.Л. Влияние способа формования пленок на взаимодействие в смесях полигидроксибутират–полиуретан // *Журнал прикладной химии.* 2015. Т. 88. №2. С. 307-312.
11. Ольхов А.А., Панкова Ю.Н., Гольдштрах М.А., Косенко Р.Ю., Маркин В.С., Ищенко А.А., Иорданский А.Л. Структура и диффузионные свойства пленок на основе смесей полиамид—полигидроксибутират // *Материаловедение.* 2015. № 10. С. 20-27.