

*На правах рукописи*

**АНТИПИНА МАРИЯ НИКОЛАЕВНА**

**ПОЛИМЕРНЫЕ МУЛЬТИСЛОЙНЫЕ КАПСУЛЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ  
ОПТИМАЛЬНОГО БИОЭФФЕКТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Саратов – 2016

**Работа выполнена**

в ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

**Научный консультант**

Доктор химических наук, доцент Горин Дмитрий Александрович

**Официальные оппоненты:**

- Доктор физико-математических наук, профессор, Фейгин Лев Абрамович, главный научный сотрудник ФГУ «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН»
- Доктор физико-математических наук, профессор, Солдатов Александр Владимирович, директор Международного исследовательского центра «Интеллектуальные материалы» ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет»
- Доктор биологических наук, доцент, Дыкман Лев Абрамович, ведущий научный сотрудник ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

**Ведущая организация:**

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 212.243.05 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, у. Астраханская, 83

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

Автореферат разослан \_\_\_\_\_  
(дата)

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 212.243.05

А.Н. Павлов

## I. Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Лекарственные средства, проявляющие специфическую направленную активность в поврежденных органах и тканях, смогут существенно увеличить эффективность медикаментозного лечения многих заболеваний, снизить вероятность побочных эффектов и облегчить лекарственную нагрузку на организм пациента. Задача создания подобных препаратов связана с разработкой микроскопических наноструктурированных «транспортных средств» – капсульных систем, позволяющих изолировать биологически активные вещества (БАВ) от окружающей среды и доставлять их строго к месту назначения. «Идеальная» капсула должна быть изготовлена из биосовместимого материала, не вызывающего воспалений или аллергических реакций, и содержать БАВ в количестве, достаточном для того, чтобы помимо терапевтического эффекта обеспечить оптимальные условия введения лекарства в организм. Проницаемость капсулы, стабильность её структуры и средства контроля её попадания в клетки-мишени должны учитывать широкий ряд факторов, включающих способ введения препарата, условия, необходимые для достижения его оптимального терапевтического эффекта, строение и биологические свойства мишени в совокупности с её физико-химическим окружением. Таким образом, инкапсулирование с целью доставки БАВ к месту назначения *in vivo* является комплексной задачей, требующей значительных фундаментальных и прикладных исследований на стыке биологии, физики, химии и клинической медицины.

В качестве первых транспортных средств для доставки БАВ были использованы вирусы, не способные к репликации, например, ретровирус, аденовирус, адено-ассоциированный вирус и вирусы простого герпеса. Вирусы послужили эффективными переносчиками целевых ДНК в ядра клеток-мишеней, и до сих пор используются в биотехнологии; однако такие недостатки, как малая ёмкость, большие трудозатраты в сочетании с риском возникновения цитопатических эффектов и мутагенеза существенно ограничивают их применимость *in vivo*.

С появлением и развитием нанотехнологий и тераностики особый интерес вызвало использование наночастиц, одновременно выполняющих роль контрастного агента и транспортного средства для БАВ. Некоторые виды наночастиц уже находятся на стадии доклинических исследований, однако опасения вызывают их токсичность, тенденция к накоплению в тканях вместе с узким диапазоном размеров, разрешенных к использованию государственными исполнительными органами.

Самоорганизация макромолекул в живых системах – феномен, который в настоящее время является ключевым предметом исследования молекулярной

биофизики,<sup>1</sup> – побудила ученых на создание липосом и блоксополимерных мицелл для инкапсулирования и доставки БАВ. Основные сложности при использовании липидных и блоксополимерных транспортных систем связаны с отсутствием универсальности загружаемых молекул: различия в их физико-химических свойствах требуют трудоемкой и длительной оптимизации состава и структуры капсулы для каждого индивидуального инкапсулируемого соединения, а зачастую – и разработки новых материалов, что влечет за собой длительный и дорогостоящий процесс тестирования безопасности их применения в пациентах.

С помощью послойной самоорганизации макромолекул на поверхности субстрата<sup>2</sup> была разработана универсальная платформа для получения капсульных систем, способных транспортировать все известные классы БАВ. Для получения капсул не требуется специального дорогостоящего оборудования, при этом их размер, состав и проницаемость могут легко варьироваться в широком диапазоне. Метод дает возможность варьировать тип материалов для сборки капсулы, встраивать в неё структурные элементы для контроля доставки и высвобождения ингредиентов, а также получать капсулы, состоящие из нескольких микрокомпарментов, которые в определенной степени могут рассматриваться как функциональная модель биологических клеток. Поверхность капсулы может быть пассивирована для предотвращения нежелательной активации иммунной системы и/или декорирована специфическими лигандами для контролируемой доставки БАВ к месту действия. Установленный факт интернализации полимерных мультислойных капсул соматическими клетками в процессе эндоцитоза<sup>3</sup> предопределил насущность активной разработки этой системы для применения в наномедицине, а также в генной и иммунной терапии. Более того, возможность наполнять капсулы БАВ разнообразной направленности делает актуальной задачу адаптации капсул для последующего использования в функциональных пищевых продуктах и косметических средствах.

**Степень разработанности проблемы.** Различные аспекты доставки БАВ с помощью капсул, получаемых послойной самоорганизацией макромолекул, активно исследуются научными группами Г. Сухорукова, Ю. Львова, Ц. Гао, А. Скиртача, С. Сухишвили, М. Рабнера, Д. МакКлементса, Х. Боймлера, и др. К настоящему времени уже разработаны способы наполнять мультислойные полимерные капсулы БАВ, имеющими различные физические и химические

---

<sup>1</sup>Waigh T.A. Applied Biophysics. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

<sup>2</sup>Sukhorukov G.B. et al. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design // Polym. Adv. Technol. 1998. Vol. 9, № 10-11. P. 759–767.

<sup>3</sup>De Geest B.G. et al. Intracellularly degradable polyelectrolyte microcapsules // Adv. Mater. 2006. Vol. 18, № 8. P. 1005–1009.

свойства. Так, в литературе описаны методы получения капсул, содержащих белки, энзимы, полисахариды, нуклеиновые кислоты, лекарственные препараты разной направленности, дисперсную фазу эмульсий, а также бактериальные и соматические клетки. Для многих БАВ была достигнута высокая степень загрузки, и разработаны способы их контролируемого высвобождения в ответ на изменение условий окружающей среды: pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала или на повышенные концентрации специфических химических веществ. Идея встраивания в мультислой металлических наночастиц и их агрегатов реализовалась в таких уникальных свойствах капсул, как резкое высвобождение содержимого в ответ на дистанционно-оказываемые воздействия лазерным излучением, магнитным полем или ультразвуком. Показательно, что воздействие лазером позволяет вскрывать капсулы одну за другой в желаемый момент времени и в желаемом месте, а помещение капсул в магнитное поле не только способно контролировать скорость высвобождения содержимого, но и контролируемо перемещать капсулы в пространстве.<sup>4</sup>

Несмотря на множество данных, показывающих высокую эффективность применения полимерных мультислойных капсул *in vitro*, вакцины, полученные на их основе в группе Б. де Гееста, остаются пока единственным свидетельством успешной практической реализации их преимуществ *in vivo*. Проблемы, возникающие при трансляции капсул с микросистемы клеточных культур и тканей на макросистему целого организма, связаны прежде всего с рядом нерешенных экспериментальных задач, приводящих к:

- а) потере биологической активности молекул в процессе инкапсулирования. Большинство известных способов заключения БАВ в полимерные мультислойные предполагает воздействие на них сред с полярным pH, высокой ионной силой или неблагоприятной температурой. Более того, взаимодействие загружаемых молекул с материалом капсулы может нарушать их пространственную конформацию и тем самым – биологическую активность. Вышеуказанные проблемы стоят особенно остро для таких важных БАВ, как белки и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Например, среди всех известных типов молекул РНК успешная доставка полимерными мультислойными капсулами продемонстрирована только для малого интерферирующего типа (миРНК), причём имеются свидетельства того, что наблюдаемое подавление экспрессии целевых генов связано непосредственно с интернализацией капсул, а не с биоэффектом доставляемой миРНК.<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup>Delcea M., Möhwald H., Skirtach A.G. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. Vol. 63, № 9. P. 730–747.

<sup>5</sup>Becker A.L. et al. Redox-Active Polymer Microcapsules for the Delivery of a Survivin-Specific siRNA in Prostate Cancer Cells // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5, № 2. P. 1335–1344.

- b) повреждению БАВ при хранении в капсулах и транспортировке к биологическим мишеням активными формами кислорода и прооксидантами.
- c) воспалениям и аллергическим реакциям, поскольку большинство катионных полипептидов, применяющихся для сборки капсул за счёт электростатических взаимодействий, обладают высокой токсичностью из-за способности адсорбироваться на поверхности противоположно заряженных клеточных мембран, угнетая жизнедеятельность клеток.
- d) ограниченной применимости капсул в косметических средствах и функциональных пищевых продуктах из-за дороговизны исходных материалов.
- e) отсутствию надежного контроля высвобождения активных веществ, которое связано с тем, что изменения физико-химических параметров в жидких средах организма зачастую не столь значительны, чтобы вызвать деградацию капсулы, а физические методы управления проницаемостью полимерной мультислойной плёнки нуждаются в доработке, чтобы успешно применяться *in vivo*. При этом отсутствует систематическое исследование механизма и физических параметров спонтанного высвобождения молекул из капсулы.
- f) плохому сочетанию материала капсулы и материала темплата, что особенно затрудняет задачу получения биосовместимых наноразмерных капсул. Большинство коллоидных частиц-темплатов, размер которых легко контролировать при синтезе, оказывается непригодным для сборки капсул из биологических полимеров. Частицы фатерита являются идеальным темплом для биodeградируемых капсул, однако целенаправленные исследования по контролируемому получению наноразмерных частиц, а также предотвращению перекристаллизации наноразмерных частиц фатерита в более термодинамически стабильные формы карбоната кальция, пока не проводились.
- g) низкой эффективности инкапсулирования и неконтролируемому высвобождению водорастворимых низкомолекулярных веществ. Капсула полностью проницаема для ионов и молекул массой менее 1 кДа, тогда как широкий ряд лекарственных препаратов, в особенности противораковых лекарств, попадает именно в эту категорию.

**Целью** исследования является разработка капсульных систем, получаемых посредством послойной супрамолекулярной самоорганизации биополимеров, для последующих применений в биотехнологической и фармацевтической промышленности, изготовлении косметических средств и средств персонального пользования.

Для достижения данной цели потребовалось решить следующие научные задачи:

- Адаптировать способы инкапсулирования для обеспечения структурной стабильности и необходимого биологического эффекта транспортируемых активных веществ.
- Разработать капсулы, обладающие защитной функцией, для эффективного предотвращения перекисного окисления липидов.
  - ✓ Определить основные факторы перекисидации в эмульсии типа масло-в-воде.
  - ✓ Сконструировать защитную оболочку, лимитирующую диффузию прооксидантов сквозь полимерную мультислойную плёнку.
  - ✓ Провести сравнительный анализ эффективности защиты, обеспечиваемой разработанными капсулами и общеизвестными антиоксидантами.
- Исследовать механизм спонтанного высвобождения белка из капсул, полученных посредством послойной самоорганизации пары комплементарных полиэлектролитов полисахарид/полипептид.
- Разработать и получить стабильные капсулы, деградирующие под действием протеолитических энзимов, без использования токсичных и дорогостоящих поликатионов.
- Получить биodeградируемые и биосовместимые наноразмерные капсулы, способные удерживать низкомолекулярные вещества.
  - ✓ Исследовать факторы, стабилизирующие наноразмерные частицы фатерита, которые образуются при смешивании растворов солей.
  - ✓ Получить наноразмерные частицы фатерита – темплаты для биodeградируемых капсул.
  - ✓ Получить капсулы, загруженные веществом, представляющим собой модель многих лекарственных средств, включая противораковые препараты, универсальные пищевые добавки и традиционные фитолечения.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования являются полые наноструктурированные капсулы диаметром от нескольких сотен нанометров до нескольких микрон, получаемые с помощью послойной самоорганизации молекул комплементарных биополимеров на поверхности темплата. Предметом исследования является адаптация физических параметров и молекулярного состава капсулы, а также методов инкапсулирования для достижения оптимального биологического эффекта активного вещества и последующего применения капсул в живых системах.

**Методологическая, теоретическая и эмпирическая база исследования.** Работа базируется на теоретическом материале и аналитических данных по

самоорганизации биологических макромолекул – белков, полипептидов, полисахаридов и нуклеиновых кислот, который, в свою очередь, заложен в основу метода послойного формирования водонерастворимого комплекса комплементарных биополимеров на поверхности темплата. В работе также используются накопленные к настоящему времени знания о способах получения замкнутых микрокапсул, используя разнообразные межмолекулярные взаимодействия, и о механизмах контроля их физических параметров: размера, толщины и проницаемости.

Часть работы, касающаяся получения наноразмерных кристаллов фатерита, основывается на положениях классической теории нуклеации и начальных стадий роста кристаллов, а также теории переконденсации.

### **Научные результаты, выносимые на защиту:**

1. Метод инкапсулирования «молекулярных коктейлей» для предотвращения деградации БАВ в процессе включения в полимерную мультислойную капсулу. В основе метода лежит адсорбция активного вещества в поры частиц фатерита вместе с так называемым «веществом-протектором», в роли которого, могут выступать молекулы, связывающиеся с БАВ и стабилизирующие их структуру, либо молекулы, ингибирующие действие повреждающих факторов окружающей среды. Результат применения метода, заключающийся в транспортировке и высвобождении вещества в активной форме, подтвержденный наблюдаемым биологическим эффектом.

2. Нивелирование перекисного окисления липидов инкапсулированного масла в течение многодневного хранения при биологически релевантной температуре без доступа света. В качестве фактора антиоксидантной защиты в капсуле выступает слой таниновой кислоты, связывающий ионы переходных металлов. Роль катионов переходных металлов, как основных прооксидантов *in vitro*, на которую косвенно указывает экспериментально подтвержденная эффективность капсулы. Установленное влияние типа антиоксиданта (превентивный или останавливающий, разрывающий цепную реакцию) на эффективность защитной функции капсулы.

3. Механизм инкапсулирования и высвобождения молекул, несущих заряженные группы, из капсул, стабилизированных электростатическими взаимодействиями, который отражает взаимодействие молекул БАВ с нескомпенсированными электростатическими зарядами в капсуле. Варьирование способа загрузки капсулы, как метод, позволяющий регулировать эффективность инкапсулирования и показатели релиза.

4. Капсулы типа сывороточный белок/полифенол, обладающие селективной чувствительностью к действию протеолитических энзимов. Отсутствие вклада



электростатики при сборке капсулы. Мультислойные капсулы не деградируют после экстракции темплата и способны удерживать гидрофильные высокомолекулярные вещества. Трёх комплементарных слоёв (сывороточный белок/полифенол/сывороточный белок) достаточно для стабильного инкапсулирования гидрофобных БАВ.

5. Роль полиолов как добавок, предотвращающих перекристаллизацию фатерита в более стабильные полиморфы. Концентрация солей, количество спиртовых групп в системе и вязкость солевых растворов – основные параметры, влияющие на размер синтезируемых частиц. Определённые условия получения наноразмерных частиц фатерита в присутствии полиолов: концентрация солей – 0.1 М, содержание добавки (глицерина) – 83.3(3)% об., температура – 25 °С.

6. Наноразмерные капсулы из противоположно заряженных биополимеров, загруженные водорастворимым соединением, имеющим молекулярную массу < 1 кДа.

#### **Научная новизна результатов исследования:**

1. Предложен метод «молекулярных коктейлей», позволяющий загружать биodeградируемые мультислойные капсулы БАВ, чувствительными к изменению физико-химических параметров окружающей среды. Метод создаёт условия, в которых в системе совместно с БАВ присутствуют «вещества-протекторы», что обеспечивает стабильность их структуры и биологических свойств как в процессе инкапсулирования, так и на этапе транспортировки к биологическим мишеням. С помощью предложенного метода впервые была осуществлена трансфекция клеток полимерными мультислойными капсулами, содержащими молекулы матричной РНК.

2. Разработаны функциональные защитные капсулы, чья активная роль состоит в экстракции повреждающих факторов из дисперсионной среды и предотвращении их взаимодействия с транспортируемыми БАВ. Практической реализацией разработки стало впервые продемонстрированное полное подавление процесса перекисного окисления липидов инкапсулированного льняного масла по крайней мере в течение двух недель хранения при 37 °С в темноте. Для капсульной системы впервые показано ключевое влияние способа антиоксидантной защиты и распределения антиоксиданта в капсуле на эффективность защиты.

3. Исследован механизм высвобождения амфотерных молекул белка из мультислойных капсул, собранных посредством самоорганизации противоположно заряженных биосовместимых полиэлектролитов. Показана и раскрыта роль способа инкапсулирования и особенностей взаимодействия молекул содержимого капсулы с

полимерной сеткой, как факторов, позволяющих контролировать такие физические параметры, как эффективность загрузки капсулы, скорость высвобождения и общее количество высвобождаемого вещества.

4. Получены стабильные мультислойные капсулы типа сывороточный белок/полифенол без вклада электростатических взаимодействий между комплементарными слоями в их структуре, и показана возможность использовать эти капсулы для доставки как гидрофильных, так и гидрофобных веществ. Впервые для полимерных мультислойных капсул показано, что из протеолитических энзимов, специфически катализирующих гидролиз белков по определенным точкам (трипсин и  $\alpha$ -химотрипсин), для деградации капсул подходит только  $\alpha$ -химотрипсин, благодаря способности преимущественно расщеплять белки после остатков ароматических и гидрофобных (лейцина и метионина) аминокислот и неспецифической активности.

5. Проведено систематическое исследование влияния присутствия полиолов на морфологию и размер частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезируемых при смешивании солей  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , на основе которого выработан протокол для стабильного получения наноразмерных частиц фатерита.

6. Получены наноразмерные капсулы с биodeградируемой полимерной композицией и произведена их загрузка низкомолекулярным соединением, служащим моделью многих лекарственных средств, включая противораковые препараты, универсальные пищевые добавки и традиционные фитолечения, причём размер полученных наноразмерных капсул соответствует размеру систем доставки лекарств, применимых в наномедицине.

**Научная и практическая значимость работы.** Результаты работы вносят вклад в усовершенствование структуры и методов получения полимерных мультислойных капсул и послужат эмпирической базой для решения целого ряда задач биомедицины, а также технологий, применяемых в косметической и пищевой промышленности. В частности, метод «молекулярных коктейлей», чья эффективность продемонстрирована для основного фактора роста и матричной РНК, может лечь в основу разработки средств для лечения повреждений кожи и генной терапии. Выявление основного фактора перекисидации *in vitro* и разработанная на этой основе система антиоксидантной защиты эмульгированного масла имеют большой потенциал для сокращения количества используемых искусственных консервантов в косметике и продуктах питания. Исследование механизма высвобождения макромолекул из биосовместимых капсул окажется ключевым для разработок биофармацевтических препаратов на основе белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот.

Продемонстрированная селективная чувствительность плёнок типа белок/полифенол к действию протеолитических энзимов закладывает фундамент для разработок капсульных систем для доставки в кишечник БАВ, нуждающихся в дополнительной защите при прохождении агрессивной среды желудка, таких как, например, неспецифические компоненты иммунной системы, пробиотики и пр., и побуждает на исследования по созданию пролекарств. Более того, низкая стоимость молекулярных составляющих для капсул открывает возможность к их широкому применению не только в медицине, но и в качестве ингредиентов функциональных пищевых продуктов и биодобавок. Установленная возможность собирать капсулы из сывороточных альбуминов важна и для разработки средств персональной медицины, т.к. в качестве составных элементов капсулы могут браться белки, выделенные непосредственно из крови пациента, с целью погашения иммунного ответа и аллергических реакций на систему доставки. Нежелательную активацию иммунной системы позволит предотвратить и технологически простая возможность пассивации поверхности капсул, собранных из других материалов, внешним бислоем таниновой кислота/сывороточный альбумин.

Влияние присутствия полиолов на размер частиц фатерита, синтезируемого при смешивании эквимольных растворов солей, вносит вклад в общую систему знаний о процессах роста поликристаллов. Применение этой информации уже нашло место в данной работе для получения наноразмерных капсул из биodeградируемых полимеров, что имеет огромное значение для реализации потенциала полимерных мультислойных капсул в наномедицине.

**Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Достоверность полученных результатов подтверждается:

- использованием сертифицированного оборудования и наборов реагентов для получения образцов и аналитических данных
- воспроизводимостью экспериментальных данных в пределах, установленных погрешностью измерений
- опубликованием всех экспериментальных результатов, вошедших в работу, в авторитетных научных изданиях на основании положительных отзывов рецензентов, являющихся признанными экспертами в соответствующих областях науки.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Метод получения капсульных систем базируется на экспериментальных и теоретических исследованиях молекулярной биофизики, характеризующих супрамолекулярную самоорганизацию биополимеров: полисахаридов, полипептидов, белков и нуклеиновых кислот. Основы процесса перекисного окисления липидов относятся к разделу биофизики – биофизика мембранной патологии. Таким образом,

отраженные в диссертации научные положения соответствуют областям исследования «молекулярная биофизика» и «биофизика мембран».

**Апробация и реализация результатов диссертации.** Основные положения диссертационной работы докладывались на следующих научных конференциях: 34<sup>th</sup> Micro and Nano Engineering MNE 2008, Conference and Exhibition Announcement Athens – Greece, (2008); XVIII International Conference on Bioencapsulation – Porto, Portugal (2010); Molecular Material Meeting (M3) @ Singapore (2011, 2012, 2014, 2015), International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT), Singapore (2011), A\*STAR Scientific Conference, Singapore (2012), 7<sup>th</sup> Singapore International Chemical Conference, Singapore (2012), American Chemical Society Annual Meeting, New Orleans – USA (2013), Science for Future, St. Petersburg – Russia (2014), International Conference “Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications”, Saratov – Russia (2015). Всего было сделано 14 устных докладов, включая 4 приглашённых доклада.

Результаты работы легли в основу семинаров и образовательных курсов для представителей промышленных предприятий, организуемых под эгидой Агентства по Науке, Технологиям и Исследованиям (АНТИ), г. Сингапур, и послужили базой для совместных научно-прикладных инновационных проектов с компаниями P&G, Symrise, L’Oreal.

**Личное участие автора в получении результатов.** Соискатель принимала личное участие в получении всех результатов, лежащих в основе диссертационной работы. Экспериментальные данные были получены либо непосредственно соискателем, либо сотрудниками и аспирантами возглавляемой ею научной группы. В последнем случае вклад соискателя состоял в постановке научной задачи, составлении протокола исследования, обсуждения результатов, координации и руководстве экспериментами, а также в подготовке результатов работ к публикациям. С активным участием соискателя были подготовлены и опубликованы 5 обзоров литературы и глава в монографии, посвященные различным аспектам инкапсулирования в самоорганизующиеся полимерные мультислои.

**Публикации.** Основные результаты по теме диссертации изложены в 20 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, 1 монографии, рецензируемых трудах 3 конференций (ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY Volume: 241, Meeting Abstract: 300-PMSE, published: MAR 27 2011; ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY Volume: 243, Meeting Abstract: 237-PMSE, published: MAR 25 2012; ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

Volume: 245, Meeting Abstract: 108-COLL, published: APR 7 2013), а также в 3 международных патентных заявках.

**Гранты.** Научные исследования, послужившие основой диссертационной работы, были поддержаны следующими грантами:

- ✓ Грант Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации;
- ✓ Грант Бюро Объединённых Исследований, АНТИ, г. Сингапур No 1231AFG022;
- ✓ Грант Бюро Объединённых Исследований, АНТИ, г. Сингапур No 14302FG090.

**Объём, логика и структура работы** обусловлены поставленной целью и решаемыми научными задачами. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, приложений и библиографии. В тексте работы содержится 6 таблиц, 2 схемы и 80 рисунков. Общий объём работы составляет 210 страниц.

## **II. Основные положения диссертации**

### **Инкапсулирование «молекулярных коктейлей»**

Метод инкапсулирования макромолекул посредством их предварительной физической адсорбции порами частиц фатерита, последующим синтезом мультислойной капсулы и растворением  $\text{CaCO}_3$  признан наиболее безопасным с точки зрения сохранения функциональности и структурной целостности БАВ. Помимо этого, эффективность инкапсулирования веществ с поверхностно-активными свойствами, таких как, например, бычий сывороточный альбумин (БСА), была существенно выше при использовании фатерита по сравнению с другими способами загрузки (результаты и обсуждение см. ниже). Данный метод использует две вариации. В первом случае загружаемые молекулы оказываются захваченными порами частиц в момент соосаждения с  $\text{CaCO}_3$ , а во втором – адсорбируются в поры предварительно синтезированных темплатов. Так как в первом случае количество включенных молекул оказывается существенно выше, что связано с особенностью внутренней структуры фатерита, усовершенствование метода соосаждения БАВ и  $\text{CaCO}_3$  представляется наиболее актуальной задачей.

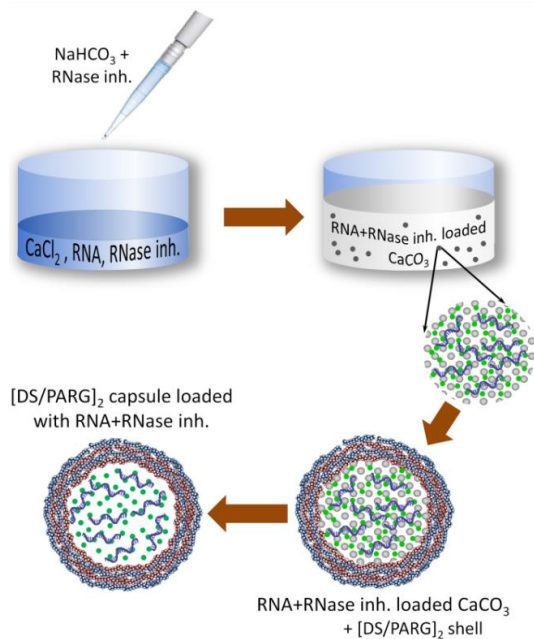
Общая идея предложенного в работе метода состоит в совместном инкапсулировании БАВ с веществами, обладающими определенным защитным механизмом действия. Таким образом, вещества-протекторы присутствуют в реакционной смеси уже при синтезе  $\text{CaCO}_3$ , попадая сначала в частицы-темплаты, а

потом и в капсулы, что обеспечивает стабильность БАВ, как во время процесса инкапсулирования, так и на всём пути капсулы к биологической цели. Эффективность метода демонстрируется в работе на примере двух веществ – матричной РНК (мРНК) и основного фактора роста фибробластов (FGF2), инкапсулирование которых по классическому методу соосаждения приводит к потере их биологической активности. При этом следует подчеркнуть, что данная работа впервые демонстрирует успешное инкапсулирование матричной разновидности РНК.

### *Инкапсулирование мРНК*

В отличие от генов, кодируемых ДНК, экспрессия генов, кодируемых РНК, не требует доставки генетического материала в ядро клетки. Однако именно трансфекция клеток молекулами рибонуклеиновых кислот оказывается более сложной задачей из-за крайней нестабильности последних. Основной причиной этого является активное выделение живыми организмами в окружающую среду внеклеточных рибонуклеаз (РНКаз) для первичной защиты от РНК-содержащих вирусов, которые эффективно деактивируют молекулы РНК уже на стадии их включения в капсулу. Таким образом, чтобы сохранить биологическую активность молекул РНК, необходимо обеспечить присутствие мощных ингибиторов РНКаз непосредственно в процессе инкапсулирования.

Согласно предложенному в работе методу «молекулярных коктейлей», соосаждение РНК и частиц фатерита происходит в присутствии ингибитора РНКаз. В эксперименте в растворы солей ( $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaHCO}_3$ ) и в раствор РНК добавляли соответствующий ингибитор в соотношении 1:100 по объёму. Раствор РНК затем смешивали с раствором  $\text{CaCl}_2$ , после чего к полученной смеси добавляли  $\text{NaHCO}_3$  (Рисунок 1). Синтезированные таким образом частицы  $\text{CaCO}_3$  содержали «молекулярный коктейль», состоящий из мРНК и ингибитора РНКаз. Затем были получены биodeградируемые капсулы с помощью последовательного наращивания мультислойной плёнки и растворения  $\text{CaCO}_3$  под действием 0.2 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Компонентами капсулы послужили поли-L-аргинин (п-L-Ар) (исх. поли-L-аргинина гидробромид) и декстран сульфат (ДекС) (исх. декстран сульфат, натриевая соль). Растворы обоих биополимеров (2 мг/мл) дополнительно содержали 0.5 М  $\text{NaCl}$ , чтобы обеспечить достаточную толщину капсульного слоя. Готовая капсула состояла из двух полимерных бислоев – [ДекС/п-L-Ар]<sub>2</sub>.



**Рисунок 1.** Метод инкапсулирования «молекулярных коктейлей» на примере мРНК (графическое представление).

Одновременно с молекулами мРНК в процессе соосаждения участвует ингибитор РНКаз, добавляемый в растворы мРНК,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaHCO}_3$ .

Синтезированные частицы  $\text{CaCO}_3$ , содержащие мРНК+ингибитор РНКаз, используются для того, чтобы собрать на их поверхности мультислойную капсулу [ДекС/п-L-Ар]<sub>2</sub>.

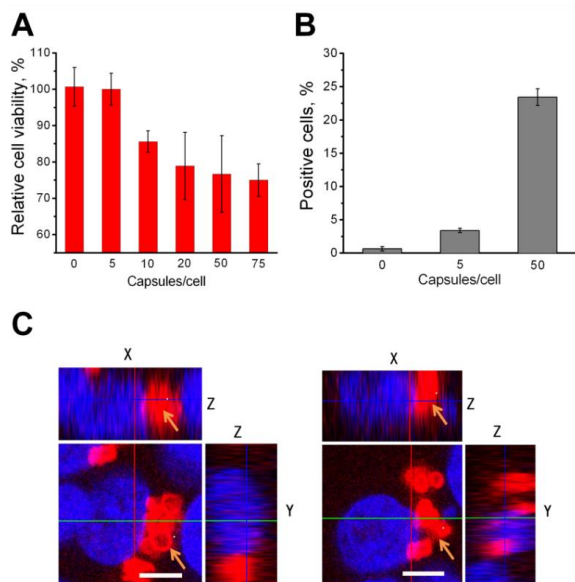
На следующем этапе  $\text{CaCO}_3$  растворяется под действием ЭДТА. [4]

Дополнительными мерами по предотвращению деградации в процессе инкапсулирования мРНК послужили: 1) добавление ингибитора РНКаз в растворы полимеров, составляющих капсулу (в соотношении 1:500 по объёму); 2) понижение основности раствора  $\text{NaHCO}_3$  до рН 7.4; 3) предварительное автоклавирование деионизованной воды и всех используемых растворов солей; 4) применение очищенной от нуклеаз воды для приготовления растворов мРНК; 5) проведение реакции соосаждения  $\text{CaCO}_3$  и «молекулярного коктейля» в ёмкости плоскодонной ячейки стерильного микротитрационного планшета (24 ячейки); 6) формирование полимерного мультислойного комплекса в ёмкости стерильных трубок для центрифугирования; 7) контроль рН при растворении фатерита, для чего раствор ЭДТА был приготовлен в Трис-буфере (рН 8).

Применение капсул в качестве системы для транспорта БАВ *in vitro* и *in vivo* требует оценки цитотоксичности мультислойной плёнки, а также способности целевой клеточной линии интернализировать капсулы. Критерием цитотоксичности капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>2</sub> послужила выживаемость клеток НЕК293Т после 48 часов культивации в присутствии пустых капсул, рассчитанная относительно контроля – клеток, выращиваемых в питательной среде без добавления капсул. Как можно видеть на Рисунке 2А, капсулы, добавленные в количестве, не превышающем 50 к/к, не оказывали существенного негативного влияния на рост и пролиферацию клеток НЕК293Т.

Уровень интернализации капсул клетками НЕК293Т оценивали по данным проточной цитометрии. Согласно требованиям аналитического метода, в структуру капсул был включен слой молекул поли-L-аргинина, меченных флуоресцентным

тетраметил-родамин-изотиоцианатом (ТРИТЦ). Диаграмма, приведенная на Рисунке 2В, свидетельствует о прямой зависимости количества интернализированных капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>2</sub> от их изначальной концентрации. При оптимальной (по соображениям цитотоксичности) концентрации капсул (50 к/к) ~23% от общего числа клеток в культуре содержало по меньшей мере одну капсулу.



**Рисунок 2.** Взаимодействие капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>2</sub> с клетками HEK293T:

(А) Жизнеспособность клеток HEK293T после 48 часов культивации с капсулами.

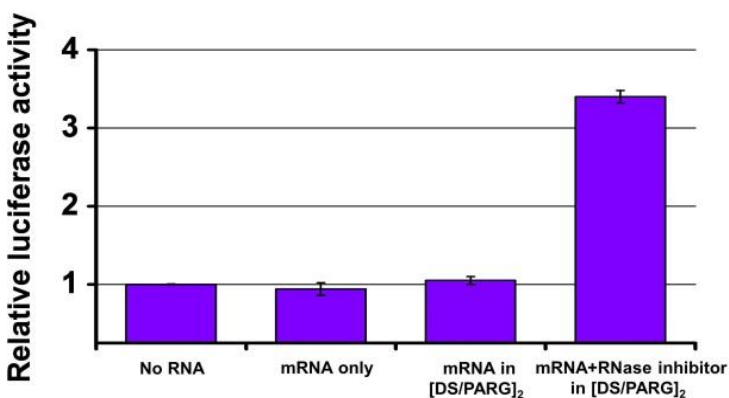
(В) Количество клеток, содержащих по меньшей мере одну капсулу через 48 часов.

(С) Клетки HEK293T с интернализированными капсулами (репрезентативные изображения КЛСМ). Центральный квадрат – проекция XY, боковые прямоугольники – ортогональные проекции XZ и YZ, соответственно. Шаг в серии оптических срезов – 1 мкм. Шкала на микрофотографиях соответствует 5 мкм. [4]

Реконструкция объёмного изображения по серии оптических срезов, полученных с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ), позволяет изучать распределение интернализированных флуоресцентных капсул внутри клеток HEK293T. Перед получением микрофотографий клетки культивировали в течение 48 часов в присутствии 50 к/к, затем клетки были промыты, чтобы удалить непоглощенные капсулы, а их ядра помечены синим флуоресцентным красителем Хехст. Рисунок 2С свидетельствует о том, что капсулы локализованы в цитоплазме в непосредственной близости от клеточного ядра, что подтверждается их нахождением в одной плоскости с ядром на оптическом срезе и ортогональных проекциях.

Для сравнения эффективности доставки мРНК в разных формах была синтезирована репортерная мРНК, кодирующая люциферазу. Уровень экспрессии репортерного гена и, соответственно, эффективности трансфекции, определялся по активности люциферазы в лизате трансфектированных клеток HEK293T, полученном через 16 часов после добавления репортера в питательную среду. Как видно из Рисунка 3, активность люциферазы выше фоновой наблюдалась исключительно в клетках, подвергшихся трансфекции мРНК, помещённой в капсулы в коктейле с ингибитором РНКаз.





**Рисунок 3.** Активность люциферазы в лизате клеток НЕК293Т через 16 часов после трансфекции репортерной мРНК.

Слева направо:

- ✓ без репортера
- ✓ репортер в свободной форме
- ✓ репортер в капсулах
- ✓ репортер+ингибитор РНКаз в капсулах. [4]

### *Инкапсулирование основного фактора роста фибробластов*

Основной фактор роста фибробластов (FGF2) – белок, регулирующий такие важные аспекты жизнедеятельности клеток, как их миграция и метаболизм. FGF2 участвует в процессах регенерации тканей и заживлении ран, стимулируя рост и пролиферацию фибробластов и капиллярных эндотелиальных клеток.<sup>6</sup> Более того, было показано, что FGF2 поддерживает пролиферацию стволовых клеток без их дифференциации в соматические.<sup>7</sup> Важная роль и множество функций, выполняемых FGF2 на клеточном уровне, обуславливает повышенный интерес к разработкам методов его доставки в клетки и ткани со стороны биотехнологии и медицины. В связи с высокой подверженностью FGF2 денатурации под воздействием температуры, pH и ионной силы, для его доставки необходимо разработать защитные капсулы.

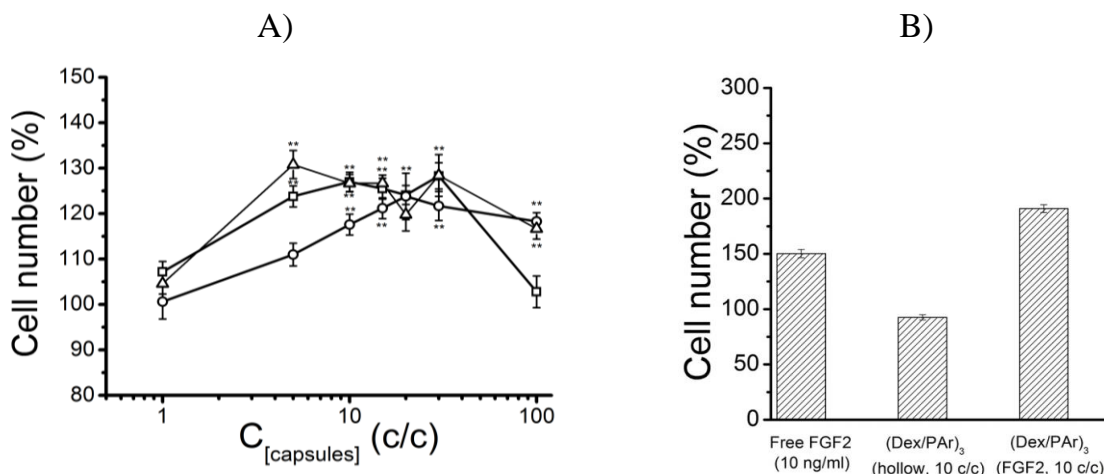
Использование метода «молекулярных коктейлей» позволяет включать FGF2 в капсулы совместно с гепарином (белком, связывающим FGF2), обеспечивая тем самым его стабильную биологическую активность. По данным литературы,<sup>8</sup> гепарин способствует сохранению биологической активности 80% молекул FGF2 водном растворе при 37 °С в течение 2 дней, в то время как без гепарина в тех же условиях биологически активными остаются только 10% от общего числа молекул. Бычий сывороточный альбумин (БСА) также способствует сохранению активности FGF2 и рекомендуется в качестве компонента для его концентрированных и разбавленных растворов. Это позволяет сделать вывод о том, что полимерные мультислойные капсулы, содержащие «молекулярный коктейль», могут служить как уникальным экспериментальным решением, так и надежной транспортной

<sup>6</sup>Langer R., Vacanti J. Tissue engineering // Science. 1993. Vol. 260, № 5110. P. 920–926.

<sup>7</sup>Xu, R. H. et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells// Nat. Methods. 2005. Vol. 2, № 3. P. 185–190.

<sup>8</sup>Caldwell M.A. et al. Heparin stabilizes FGF-2 and modulates striatal precursor cell behavior in response to EGF // Exp. Neurol. 2004. Vol. 188, № 2. P. 408–420.

системой для того, чтобы сохранить активность FGF2 в процессе его инкапсулирования, доставки и высвобождения.



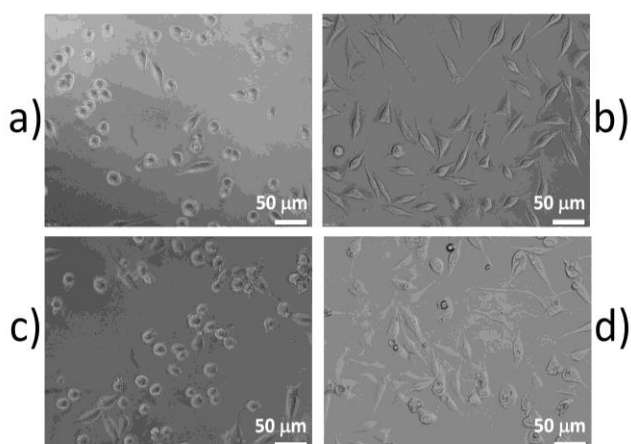
**Рисунок 4.** (А) Число клеток L929 после 3 дней культивации с капсулами [ДекС/п-L-Ar]<sub>3</sub> (-□-), [ДекС/п-L-Ar]<sub>5</sub> (-o-), [ДекС/п-L-Ar]<sub>7</sub> (-Δ-), загруженными FGF2, выраженное в % относительно контроля – клеток L929, в бессывороточной DMEM, содержащей 10 нг/мл свободного FGF2; \*\*: P < 0.05 (двухвыборочный t-критерий Стьюдента), показывающий значимое отличие результатов, полученных для исследуемой и контрольной групп.

(В) Число клеток L929 после 3 дней культивации в бессывороточной DMEM, содержащей (слева направо) 10 нг/мл свободного FGF2, пустые капсулы [ДекС/п-L-Ar]<sub>3</sub> (10 к/к), капсулы [ДекС/п-L-Ar]<sub>3</sub> (10 к/к), загруженные FGF2 в коктейле с протекторами, выраженное в % относительно контроля – клеток L929, которые культивировались в бессывороточной среде, не содержащей ни FGF2, ни капсул. [10]

Раствор FGF2 для инкапсулирования или доставки к клеткам в свободной форме готовили следующим образом. Лиофилизированный FGF2 помещали в фосфатно-солевой буфер Дюльбекко (DPBS), уже содержащий гепарин и БСА, чтобы достичь концентрации 100 мкг/мл и весовых соотношений FGF2 и его протекторов БСА:гепарин:FGF2 = 10:10:1. При необходимости дальнейшего понижения концентрации FGF2 использовался DPBS. 1 мл 100 мкг/мл раствора FGF2 последовательно смешивали с 1 мл деионизованной воды, 1 мл 1 М CaCl<sub>2</sub> и 1 мл 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (растворы солей и деионизованная вода были предварительно простерилизованы и пропущены через фильтр с порами диаметром 0.2 мкм). В результате были синтезированы частицы CaCO<sub>3</sub>, содержащие FGF2 в коктейле с веществами-протекторами – гепарином и БСА. На следующем шаге на поверхности шаблонов собирали мультислойные капсулы разной толщины последовательной самоорганизацией биополимеров ДекС и п-L-Ar. Затем CaCO<sub>3</sub> экстрагировали 0.2 М раствором ЭДТА, имевшим рН 7 без поддержания буфером.

Эффективность метода инкапсулирования проверяли на культуре клеток L929. Клетки культивировали в присутствии капсул [ДекС/п-L-Ar]<sub>3</sub>, [ДекС/п-L-Ar]<sub>5</sub> и

[ДекС/п-L-Ар]<sub>7</sub>, содержащих FGF2 и его протекторы. Загруженные капсулы были добавлены в культуру клеток в разных концентрациях, причём предварительно было установлено, что жизнеспособность клеток не падает ниже 80% при добавлении пустых капсул в количествах, не превышающих 50 к/к. Жизнеспособность клеток оценивалась через 3 дня относительно контроля – клеток L929, культивировавшихся в присутствии 10 нг/мл свободного FGF2. (10 нг/мл попадает в определённый в работе интервал концентраций свободного FGF2, обеспечивающих максимальный уровень пролиферации клеток L929). Результат, показанный на Рисунке 4А, свидетельствует о том, что капсулы (в количестве от 5 до 30 к/к), нагруженные «молекулярным коктейлем» способствовали пролиферации клеток L929 и увеличению общего числа клеток в культуре на 10 – 30%. При этом толщина капсул не оказывала существенного влияния на наблюдаемый эффект.



**Рисунок 5.** Морфология клеток L929 после 3 дней культивации

- ✓ в присутствии 10 нг/мл свободного FGF2 (~84 % клеток – сферы) (a);
- ✓ в бессывороточной DMEM (~2 % клеток – сферы) (b);
- ✓ в присутствии капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> (5 к/к), нагруженных FGF2 в коктейле с протекторами (~82 % клеток – сферы) (c);
- ✓ в присутствии пустых капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> (5 к/к) (~1 % клеток – сферы) (d).

Количество клеток соответствует их среднему числу в трёх лунках, культивировавшихся в одинаковых условиях. [10]

На Рисунке 4В представлена жизнеспособность клеток L929, культивировавшихся 3 дня в присутствии 10 нг/мл FGF2 в свободной форме, пустых капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> в количестве 10 к/к, капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub>, нагруженных FGF2 в коктейле с протекторами, выраженное в % относительно контроля – клеток L929, культивировавшихся в питательной среде (DMEM), не содержащей ни FGF2, ни капсул. Из Рисунка 4В видно, что FGF2 в свободной форме увеличивал количество клеток до 150% по отношению к контрольной группе, тогда как белок, доставленный капсулами, увеличивал это количество ещё

более выражено – до 200%. В то же время пролиферация клеток в присутствии пустых капсул по уровню соответствовала контрольной, что свидетельствует о низкой цитотоксичности капсул.

Дополнительным подтверждением стабильной биологической активности FGF2, доставляемым капсулами, послужили результаты исследования морфологии клеток L929 (Рисунок 5). Несмотря на то, что FGF2 известен, как белок, ускоряющий митоз и пролиферацию, также известно и о его способности подавлять синтез коллагена I и III типов, что может стать причиной аномальной морфологии клеток.<sup>9</sup> Так, было обнаружено, что более 80% клеток L929 приобрели сферическую форму после культивации в среде, содержащей 10 нг/мл свободного FGF2. Такой же результат наблюдался для клеток, культивировавшихся в присутствии капсул ДекС/п-L-Ар, загруженных FGF2. В то же время и DMEM, не содержащая питательной сыворотки, и пустые капсулы не вызывали изменений морфологии клеток: количество клеток, имевших сферическую форму, было менее 5%.

### **Функциональные защитные капсулы для предотвращения пероксидации полиненасыщенных жирных кислот**

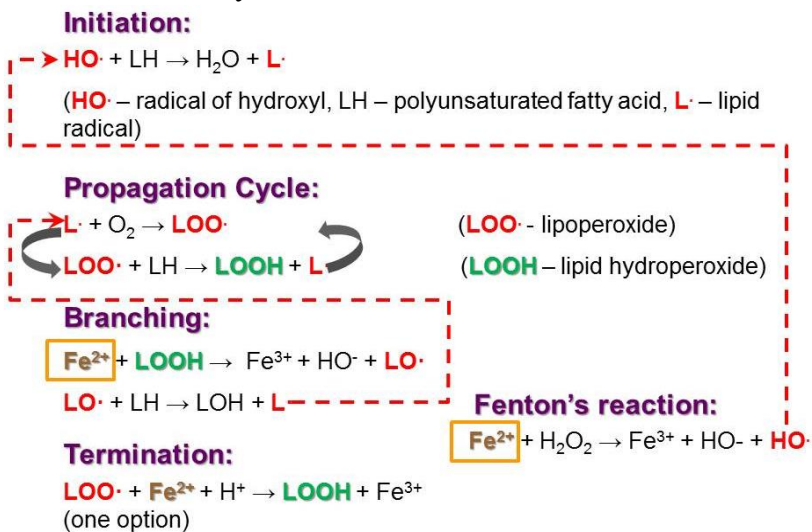
Широкий выбор материалов для сборки мультислойного комплекса и возможность варьирования типа межмолекулярных взаимодействий стимулируют поиск экспериментальных решений, нацеленных на разработку капсул со специфическими заданными свойствами. Наряду с обеспечением контролируемого высвобождения БАВ наиболее востребованной является защитная функция капсулы, призванная предотвращать деградацию веществ при их транспортировке и хранении. В сфере функциональных пищевых продуктов, биодобавок и косметических средств остро стоит задача замедления процесса пероксидации полиненасыщенных жирных кислот, которыми богаты масла растительного и животного происхождения. При этом наиболее критичной ситуация оказывается в продукции, содержащей масла в виде эмульсий, в связи с протяженностью границы раздела фаз, увеличивающей вероятность атаки липидов прооксидантами.

Большинство веществ, принимающих участие в процессе пероксидации, представляют собой небольшие молекулы или ионы, для которых полимерная мультислойная плёнка полностью проницаема. Исходя из этого, эффективным подходом является размещение в структуре капсулы защитного слоя, способного лимитировать диффузию факторов пероксидации и их взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами заключённого в ней масла. Решение

---

<sup>9</sup>Etheredge L., Kane B.P., Hassell J.R. The Effect of Growth Factor Signaling on Keratocytes In Vitro and Its Relationship to the Phases of Stromal Wound Repair // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2009. Vol. 50, № 7. P. 3128–3136.

поставленной задачи прежде всего требует выявления основных факторов пероксидации в эмульсиях *in vitro*.



**Рисунок 6.** Общая схема цепной реакции пероксидации.

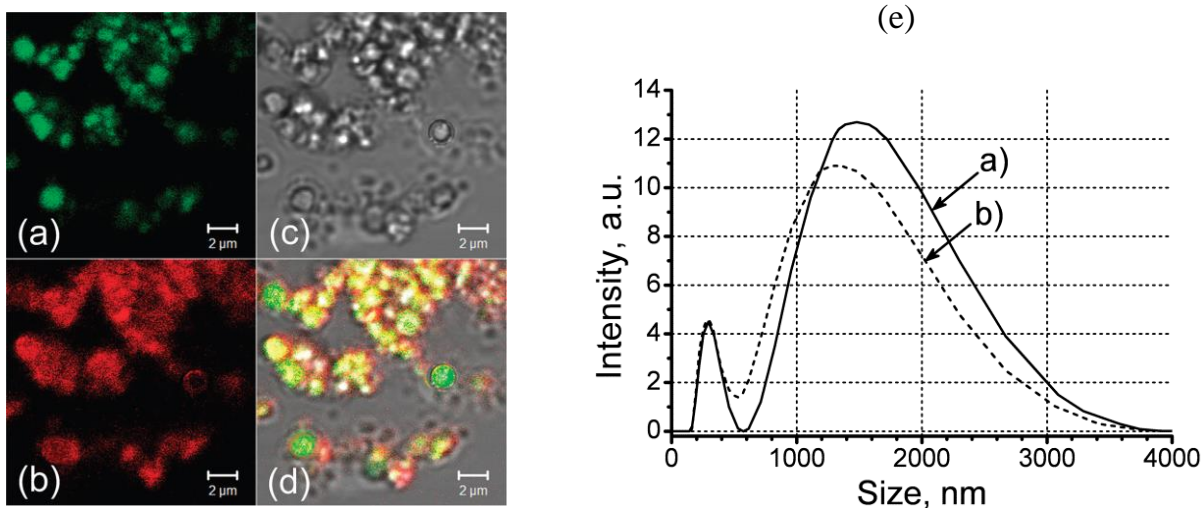
Из общей схемы процесса пероксидации при патологических состояниях клеточных мембран (Рисунок 6) можно определить, что катионы  $\text{Fe}^{2+}$ , чьи следовые концентрации зачастую сохраняются в воде, эмульгаторах и компонентах капсулы, оказываются главными прооксидантами, т.к. участвуют в двух реакциях с образованием активных форм кислорода. Это предположение подкреплено результатами других авторов, показавших, что интенсивность пероксидации в эмульсиях можно понизить, предотвратив попадание катионов переходных металлов на границу раздела фаз,<sup>10</sup> однако при этом ни одно из предложенных экспериментальных решений не позволило полностью подавить процесс деградации липидов в течение продолжительного времени. В данном разделе диссертационной работы предложено использовать таниновую кислоту (ТК) в качестве антиоксидантного слоя полимерной капсулы. Выбор этого вещества обусловлен двумя причинами: 1) ТК способна связывать катионы переходных металлов с высокой эффективностью<sup>11</sup> и 2) ТК уже предлагалась для получения мультислойных плёнок и капсул с экстрагированным темплатом.<sup>12</sup> Таким образом, основными экспериментальными задачами, решаемыми в рамках данной диссертационной работы, стали инкапсулирование масла в биосовместимые

<sup>10</sup> Mei L., Decker E.A., McClements D.J. Evidence of Iron Association with Emulsion Droplets and Its Impact on Lipid Oxidation // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46, № 12. P. 5072–5077.

<sup>11</sup> Lopes G.K.B., Schulman H.M., Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1999. Vol. 1472, № 1-2. P. 142–152.

<sup>12</sup> Shutava T. et al. pH Responsive Decomposable Layer-by-Layer Nanofilms and Capsules on the Basis of Tannic Acid // Macromolecules. 2005. Vol. 38, № 7. P. 2850–2858.

полимерные плёнки, включающие слои молекул ТК, и оценка эффективности антиоксидантной защиты полученных капсул.



**Рисунок 7.** (a) – (d) Лиофилизованные капсулы БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар (микрофотография КЛСМ). Зелёное свечение соответствует маслу, находящемуся в капсуле, красное – самой капсуле. (e) Распределение частиц по размеру, наблюдаемое в только что приготовленной суспензии капсул БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар, загруженных льняным маслом а); в суспензии предварительно лиофилизованных капсул б). [14]

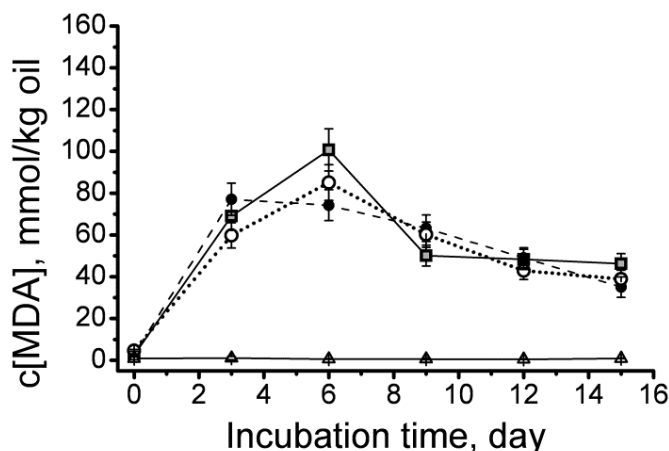
В качестве модельного вещества в работе использовалось льняное масло, по уровню содержания незаменимых жирных кислот уступающее только маслу трески. Для инкапсулирования применялся метод наращивания полимерной мультислойной плёнки на дисперсной фазе предварительно полученной эмульсии масло-в-воде, стабилизированной БСА. Компонентами капсулы послужили полипептид – поли-L-аргинин (п-L-Ар) и ТК, которая образует водонерастворимый комплекс с аргинином за счёт электростатических взаимодействий в условиях (рН, температура), аналогичных использованным в эксперименте.<sup>13</sup>

Суспензии капсул БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар, загруженных льняным маслом, оказались устойчивыми к флокуляции. Более того, лиофилизация не приводила к разрыву капсулы и вытеканию содержимого. Экспериментально это было установлено с помощью последовательно осуществленных лиофилизации и ресуспендирования капсул в воде. На Рисунке 7а–d приведена микрофотография порошка из капсул БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар, наполненных льняным маслом. С целью визуализации капсул к молекулам эмульгатора была присоединена флуоресцентная метка ТРИТЦ, излучающая в красной области оптического спектра, а в масляную фазу перед эмульгацией добавлен 3,4,9,10-тетра-

<sup>13</sup>Baxter N.J. et al. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation // Biochemistry. 1997. Vol. 36, № 18. P. 5566–5577.



(гексаоксикарбонил)перилен (ТГКП), излучающий в зелёной области. Как показано на Рисунке 7d, лиофилизация не нарушила целостности капсул – на микрофотографии отчетливо видны красные окружности, соответствующие капсулам, которые локализованы на периферии зелёных сфер – частиц льняного масла.

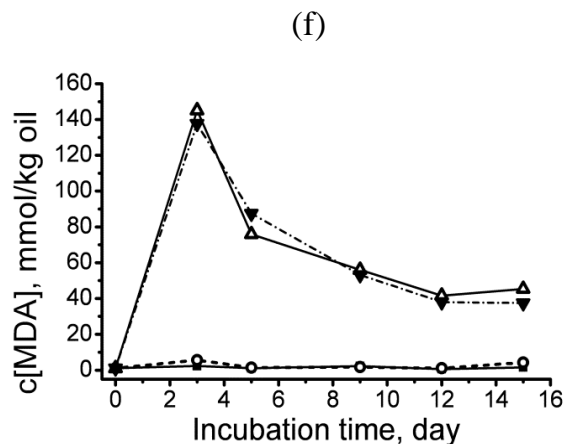
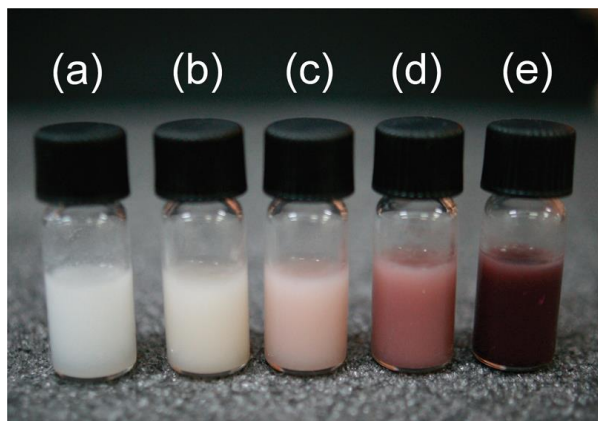


**Рисунок 8.** Концентрация малонового диальдегида в суспензиях, хранившихся при 37 °С без доступа света в зависимости от композиции и толщины капсулы:

BSA (—□—),  
 BSA/p-L-Ar (--●--),  
 BSA/p-L-Ar/ДекС/p-L-Ar (···○···),  
 BSA/p-L-Ar/ТК/p-L-Ar (—Δ—). [14]

Капсулы до и после лиофилизации+ресуспендирования были исследованы методом динамического светорассеяния (Рисунок 7е), показавшим, что распределение частиц по размерам в только что полученном образце имеет бимодальную форму, сохраняющуюся и в процессе обработки капсул. Более того, положение пиков на кривой распределения по размерам тоже не претерпевает существенных изменений. Сравнивая интенсивности пиков в свежем и обработанном образцах, можно примерно оценить потери при последовательных лиофилизации и ресуспендировании капсул. Так, было установлено, что количество капсул со средним диаметром (308±4) нм практически не изменилось после лиофилизации+ресуспендирования, а капсул со средним диаметром (1622±32) нм стало меньше на 12%. Незначительные потери при лиофилизации+ресуспендировании дополнительно свидетельствуют о высокой структурной стабильности полученных капсул.

Малоновый диальдегид (МД) является одним из молекулярных продуктов пероксидации и широко используется как маркер этого процесса. Концентрация МД может быть измерена по интенсивности поглощения ( $\lambda_{\text{макс}} = 532 \text{ нм}$ ) в триметиновом комплексе – продукте его цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Как видно из Рисунка 8, включение молекулярного слоя ТК в капсулу оказалось эффективным способом полностью предотвратить пероксидацию льняного масла в течение 15 дней хранения при 37 °С без доступа света. В тоже время капсулы всех исследованных композиций, не содержащих антиоксидант, допускали интенсивную деградацию липидов.



**Рисунок 9.** (a) – (e) Изменение цвета суспензии капсул в зависимости от их композиции и состава дисперсионной среды: (a) БСА/п-L-Ар в H<sub>2</sub>O; БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар в (b) H<sub>2</sub>O, (c) 0.03 мМ FeBr<sub>2</sub>, (d) 0.3 мМ FeBr<sub>2</sub>, и (e) 3 мМ FeBr<sub>2</sub>. (f) Содержание малонового диальдегида в суспензиях, хранившихся при 37 °С без доступа света в зависимости от толщины капсулы и концентрации прооксиданта: БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар в 0.03 мМ FeBr<sub>2</sub> (—■—), 0.3 мМ FeBr<sub>2</sub> (····○····) и 3 мМ FeBr<sub>2</sub> (---△---). БСА/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар/ТК/п-L-Ар в 3 мМ FeBr<sub>2</sub> (---▽---). [14]

Способность слоя ТК, встроенного в мультислойную капсулу, связывать двухвалентные катионы железа и ингибировать процесс перекисидации, проверяли при различных концентрациях соли FeBr<sub>2</sub> в дисперсионной среде: 0.03 мМ, 0.3 мМ и 3 мМ. Выбор C[FeBr<sub>2</sub>] = 0.03 мМ объясняется её примерным соответствием количеству свободного железа в сыворотке крови у взрослого человека, в норме попадающей в интервал от 10 до 35 мкМ.<sup>14</sup> Сразу же после добавления раствора соли FeBr<sub>2</sub> суспензии капсул меняли цвет с молочно-белого на розово-бордовый, причём интенсивность цвета имела прямую зависимость от концентрации Fe<sup>2+</sup>. Наблюдаемое изменение цвета свидетельствует о выполнении капсулами защитной функции благодаря тому, что встроенные в капсулу молекулы ТК связывают прооксидант с образованием водонерастворимого таната железа непосредственно внутри мультислойной плёнки (Рисунок. 9а–е). Результаты исследования стабильности к перекисидации при 37 °С показаны на Рисунке 9f. Мультислойная плёнка с монослоем ТК полностью предотвращала процесс перекисидации в течение времени наблюдения (15 дней) при концентрациях FeBr<sub>2</sub> 0.03 мМ и 0.3 мМ. Однако при повышении концентрации прооксиданта в 10 раз (3 мМ) капсула уже не была способна ингибировать перекисидацию. Наличие второго слоя ТК в капсуле также оказалось неэффективным. Стехиометрические расчёты антиоксидант : прооксидант в соответствующих системах показали, что защита, обеспечиваемая

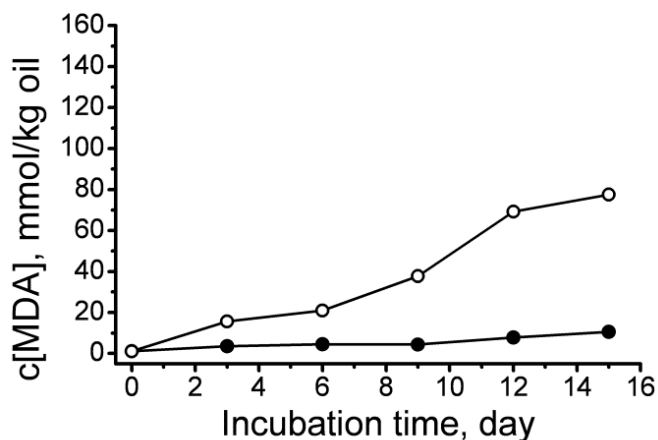
<sup>14</sup>Che P. et al. Quantitative determination of serum iron in human blood by high-performance capillary electrophoresis // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1995. Vol. 669, № 1. P. 45–51.



ТК, эффективна, если общее количество молекул антиоксиданта, включенных в капсулы, больше или примерно равняется количеству катионов прооксиданта в дисперсионной среде. Так, использование 50%-ного избытка ТК позволяло полностью изъять повреждающий фактор из дисперсионной среды, предотвратив инициацию процесса пероксидации. Отношение антиоксидант : прооксидант в случае капсул, содержащих 2 слоя ТК, помещённых в 3 мМ FeBr<sub>2</sub> оказалось  $C_{[TK]} : C_{[Fe^{2+}]} = 1 : 2.4$ . Это дает возможность предположить, что в данном случае определенное количество катионов Fe<sup>2+</sup> не связалось ТК и смогло иницировать пероксидацию за счёт свободной диффузии сквозь мультислойную плёнку к границе масляной фазы.

Согласно полученным результатам, слой ТК оказывается эффективным ингибитором пероксидации *in vitro*, однако для перспектив дальнейшего практического применения данной разработки необходимы данные, позволяющие напрямую сравнивать эффект антиоксидантной защиты, обеспечиваемой капсулами, с эффектом общеизвестных и широко используемых в промышленности антиоксидантов, таких как, например, витамин Е. Так как витамин Е не растворим в воде, единственная возможность поместить его в капсулы – это расположить непосредственно в дисперсионной фазе, т.е. в микрочастицах льняного масла. При этом необходимо учесть, что и механизмы антиоксидантной защиты витамина Е и ТК существенно различны: если ТК, связывая факторы, иницирующие пероксидацию, обладает так называемым превентивным механизмом антиоксидантной защиты, то механизм действия витамина Е можно назвать останавливающим, так как молекулы этого вещества деактивируют липопероксирадикал, который образуется по мере развития процесса пероксидации. Иными словами, в данном случае речь идет о сравнении эффективности антиоксидантной защиты, обусловленной как различной локализацией антиоксиданта в капсуле (на границе раздела фаз или внутри капсулы, содержащей масло), так и различным механизмом действия (превентивным или останавливающим, то есть разрывающим цепную реакцию процесса пероксидации).

Образцы с витамином Е были получены следующим образом. Льняное масло, содержащее 10000 миллионных долей смеси токоферолов (СТ), диспергировали в деионизованной воде в присутствии БСА, а затем на частицах дисперсионной фазы собирали мультислойную плёнку п-L-Ар/ДекС/п-L-Ар. Сравнительные измерения уровня пероксидации в капсулах, содержащих соответственно ТК и СТ, проводились в чистой воде и в присутствии 0.03 мМ FeBr<sub>2</sub> в дисперсионной среде при 37 °С без доступа света в течение 15 дней (Рисунок 10). Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на антиоксидантное действие витамина Е в чистой воде, он не способен полностью предотвратить пероксидацию.



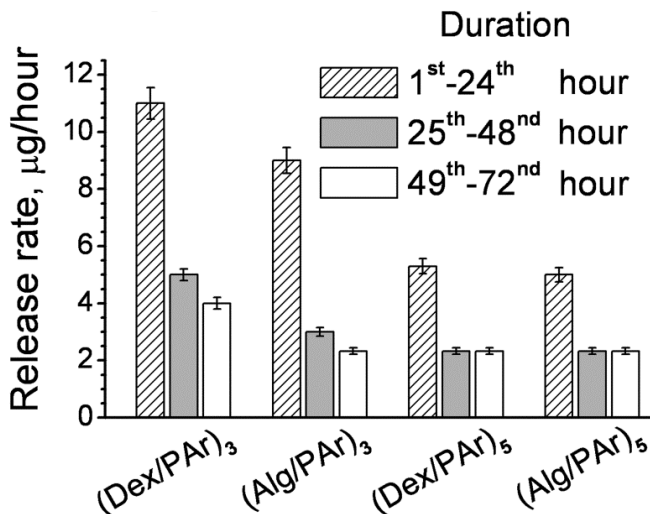
**Рисунок. 10.** Содержание малонового диальдегида в суспензиях капсул БСА/п-L-Ар/ДекС/п-L-Ар, наполненных льняным маслом. Капсулы инкубировали при 37 °С без доступа света в H<sub>2</sub>O (—●—) и в 0.03 mM FeBr<sub>2</sub> (—○—). [14]

Льняное масло в капсулах, содержащих СТ, активно подвергается перекисному окислению в присутствии 0.03 mM FeBr<sub>2</sub> в дисперсионной среде, о чем свидетельствует нарастание концентрации малонового диальдегида в образце с течением времени. По данным измерений содержания ТК в капсулах количество антиоксиданта составило (0.46±0.06) mM, то есть почти в 2 раза больше, чем витамина Е в сравниваемом образце (0.275 mM). Тем не менее данные, полученные для капсул, содержащих ТК, ресуспендированных в дисперсионной среде с более высокой концентрацией FeBr<sub>2</sub>, убедительно свидетельствуют о более надежном ингибировании процесса пероксидации полифенолом по сравнению с витамином Е. Таким образом, доказана эффективность разработанных капсул, содержащих слой таниновой кислоты, для предотвращения перекисного окисления инкапсулированных масел.

### **Механизм спонтанного высвобождения биополимеров, несущих заряженные группы, из капсул, стабилизированных электростатическими взаимодействиями**

Скорость высвобождения содержимого пропорциональна величине изначальной разности концентраций вещества снаружи и внутри капсулы, при этом полимерная мультислойная плёнка выступает в качестве разделительной мембраны, замедляющей диффузию БАВ пропорционально их молекулярной массе. Очевидным параметром, контролирующим проницаемость капсул, является их толщина, зависящая от молекулярной композиции и количества слоёв в полимерном комплексе. Более того, эффект перезарядки поверхности при самоорганизации комплементарного слоя биополимера позволяет предположить наличие нескомпенсированных электрических зарядов, с которыми могут взаимодействовать противоположно заряженные группы молекулы высвобождаемого вещества. Белки, как амфотерные полиэлектролиты, представляются интересной модельной системой для исследования возможного

вклада эффекта взаимодействия высвобождаемого вещества и полимерной сетки капсулы. В связи с активными разработками биологических препаратов, в том числе и на основе природных полиэлектролитов – белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, – исследование этой модели является также актуальным и практически значимым.



**Рисунок 11.** Скорость высвобождения БСА-ТРИТЦ из капсул ДекС/п-L-Ар и АЛГ/п-L-Ар разной толщины в 1 мл 0.15 М NaCl, T = 37 °C [16]

В проведенном исследовании моделью БАВ послужил БСА-ТРИТЦ, имеющий молекулярную массу ~66 кДа. Вывод о механизме высвобождения был сделан на основе сравнительного анализа данных, отражающих такие физические параметры, как общее количество высвобождаемого белка и скорость его высвобождения из капсул, образованных мультислойным комплексом противоположно заряженных биополимеров, композиция и толщина которого варьировались в ходе эксперимента. Так, в качестве поликатиона использовался п-L-Ар, а полианиона – либо ДекС, либо альгиновая кислота (АЛГ) (исх. альгинат натрия), при этом полученные капсулы содержали либо три, либо пять двойных полимерных слоёв. Общее количество белка, высвобожденное к определенному моменту времени, измерялось в зависимости от объёма дисперсионной среды и частоты смены супернатанта. Дополнительным параметром послужило использование двух различных методов инкапсулирования: 1) предварительной загрузки, то есть соосаждения белка и CaCO<sub>3</sub> с последующим наращиванием капсулы и экстракцией CaCO<sub>3</sub>; и 2) последующей загрузки, или загрузки белка в предварительно полученные пустые капсулы посредством диффузии сквозь полимерную мультислойную плёнку из раствора, в котором были ресуспендированы капсулы.

Как и ожидалось, скорость высвобождения белка из капсулы снижается с увеличением толщины полимерной плёнки (Рисунок 11). Для всех исследованных видов капсул было характерно интенсивное высвобождение белка в течение первых 24 часов инкубации, однако далее скорость высвобождения существенно

замедлялась, причём капсулы обеих композиций, заключающие в себе 5 двойных полимерных слоёв, обеспечивали профиль скорости высвобождения нулевого порядка с 25-го по 72-ой час нахождения в исследуемой среде.

**Таблица 1. Эффективность загрузки партии капсул\* в разных методах [16]**

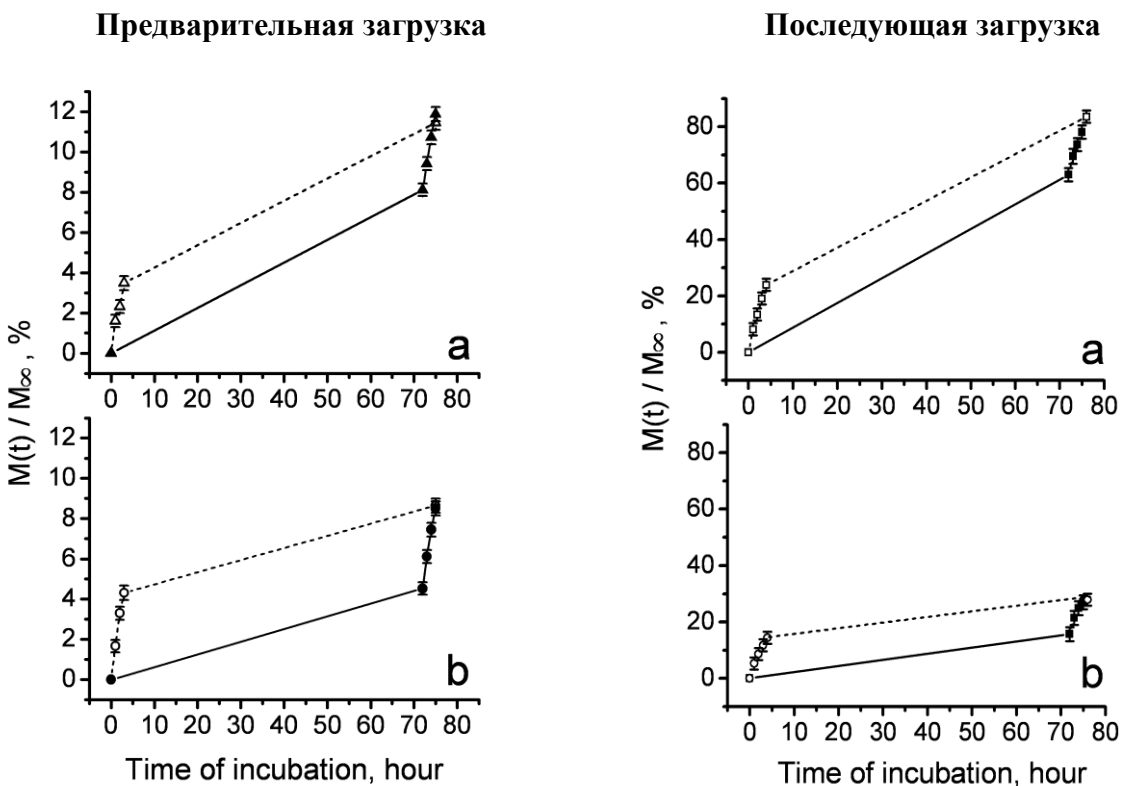
Метод загрузки	Количество загруженного белка, мг			
	[ДекС/п-L-Ар] <sub>3</sub>	[АЛГ/п-L-Ар] <sub>3</sub>	[ДекС/п-L-Ар] <sub>5</sub>	[АЛГ/п-L-Ар] <sub>5</sub>
Предварительная загрузка	5.5±0.3	6.0±0.3	6.5±0.3	7.0±0.3
Последующая загрузка	2.5±0.3	6.0±0.3	2.6±0.3	6.3±0.3

\*Исходное количество загружаемого белка – 10 мг при обоих способах загрузки. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения, рассчитанных по результатам измерений количества БСА-ТРИТЦ в супернатанте в трёх независимых экспериментах.

Из Рисунка 11 следует, что в случае капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> и [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub> влияние на скорость высвобождения белка оказывает и полианион: так, капсулы [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> высвобождали белок значительно быстрее, чем капсулы [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub>. Влияние природы полианиона также нашло отражение и в количестве загружаемого белка (см. Табл. 1). Обращает на себя внимание и то, что эффективность загрузки капсул АЛГ/п-L-Ар практически не зависела от метода инкапсулирования, тогда как для капсул ДекС/п-L-Ар предварительная загрузка оказывалась предпочтительнее. При этом капсулы обеих композиций, содержащие равное количество бислоёв, были способны (в пределах погрешности) удерживать одинаковое количество белка при использовании метода предварительной загрузки.

Способ загрузки капсулы также оказался ключевым фактором, определяющим уровень и скорость высвобождения белка (Рисунок 12). Общей характеристикой обеих исследованных композиций стал низкий уровень высвобождения содержимого из предварительно загруженных капсул – значительно ниже требуемого для исчезновения градиента концентрации через полимерную мультислойную плёнку. Так, в 1 мл дисперсионной среды за 72 часа максимально было высвобождено ~9% (из [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub>) и ~6% (из [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub>) от общего количества инкапсулированного белка. Высвобождение белка из капсул, наполненных белком методом последующей загрузки, происходило значительно более интенсивно. Менее проницаемые капсулы [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub> за 72

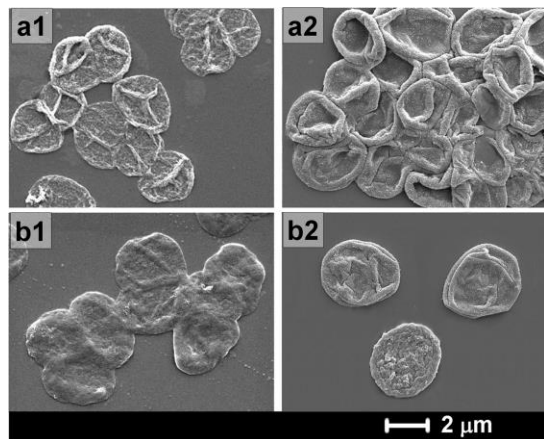
часа высвободили 28% содержимого, а более проницаемые – [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> – ~80%, однако при разработке капсул для практических применений необходимо принимать во внимание общее малое содержание белка в капсулах [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> (см. Таблицу 5.1).



**Рисунок 12.** Высвобождение БСА-ТРИТЦ из капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> (а) и [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub> (б) в дисперсионную среду (1 мл 0.15 М NaCl,  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), обновляемую при снятии данных в каждой точке, показанной на графиках. Для загрузки капсул использовался метод предварительной загрузки (слева) и последующей загрузки (справа). [16]

Полученные результаты говорят о том, что мультислойная плёнка сама по себе способна адсорбировать молекулы белка, причём наиболее вероятной причиной этого является наличие нескомпенсированных электрических зарядов внутри полимерной сетки. В результате адсорбции происходит «закупоривание» капсулы, и её проницаемость существенно снижается. Высокая скорость диффузии под действием осмотического давления при растворении  $\text{CaCO}_3$ , способствует быстрому «закупориванию» плёнки. Так как молекулы белка в этом случае движутся из капсулы во внешнюю среду, то они «закупоривают» в первую очередь её внутренние слои, препятствуя дальнейшему высвобождению груза. В итоге в предварительно загруженных капсулах оказывается больше вещества по сравнению капсулами, наполненными белком методом последующей загрузки, при котором

молекулы, диффундирующие из внешней среды, постепенно «закупоривают» внешние слои капсулы и служат препятствием для инфильтрации новых молекул. В



**Рисунок 13.** Капсулы до и после загрузки БСА (СЭМ).

(a) [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub> и  
(b) [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub>.

Пустые капсулы (a1, b1);  
Капсулы, загруженные БСА-ТРИТЦ  
методом последующей загрузки (a2, b2).  
[16]

связи с тем, что при последующей загрузке большое количество инкапсулированных молекул не попадает внутрь капсулы, а оказывается адсорбированным на внешних слоях полимерной плёнки, последующая десорбция молекул белка во внешнюю среду реализуется как быстрое высвобождение молекулярного груза. Обращает на себя внимание то, что влияние способа загрузки наиболее выражено для капсул [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub>, что скорее всего обусловлено различными адсорбционными способностями и профилями распределения молекул белка в толще капсул двух исследованных композиций. Так, если для капсул ДекС/п-L-Ар наиболее вероятным представляется распределение молекул по градиенту, сонаправленному с градиентом концентрации белка в системе капсула-внешняя среда и незначительно меньшему по модулю, то замкнутые плёнки на основе альгиновой кислоты подобны гидрогелю – они обладают высокой адсорбционной способностью и способствуют более равномерному распределению проникающих в них макромолекул.

Визуальным свидетельством аккумуляции белка в замкнутой полимерной мультислойной плёнке служит Рисунок 13, на котором представлены микрофоторафии пустых капсул исследуемых композиций и тех же капсул, загруженных БСА-ТРИТЦ методом последующей загрузки. Как следует из полученных результатов, пустые капсулы [АЛГ/п-L-Ар]<sub>3</sub> изначально оказываются значительно толще, чем [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub>, а последующая загрузка БСА утолщает капсулы обеих композиций, причём разница в толщине между пустыми и заполненными капсулами особенно заметна для плёнки [ДекС/п-L-Ар]<sub>3</sub>.

**Капсулы типа сывороточный белок/полифенол, обладающие селективной чувствительностью к действию протеолитических энзимов**

Одной из главных проблем, которые препятствуют практическому применению биосовместимых капсул, собираемых за счёт электростатических взаимодействий, является использование дорогостоящих и к тому же цитотоксичных поликатионов, что стимулирует поиски новых материалов и иных видов межмолекулярных взаимодействий для получения капсул. С этой точки зрения большой интерес представляет комбинация макромолекул БСА и ТК, самоорганизация которых на поверхности раздела приводит к образованию водонерастворимого комплекса посредством формирования большого числа водородных связей.<sup>15</sup> Более того, т.к. БСА является субстратом для протеолитических энзимов, энзиматическая деградация оказалась бы удобным способом контролировать высвобождение содержимого капсул *in vivo*. Мультислойные плёнки БСА/ТК были получены и использованы в данной работе для инкапсулирования как гидрофильных, так и гидрофобных веществ.

#### *Инкапсулирование и высвобождение водорастворимых соединений*

Для получения капсул типа белок/полифенол на темплат ( $\text{CaCO}_3$ , соосажденный с молекулами БСА) был предварительно нанесен якорный слой п-L-Ар, необходимый для обеспечения стабильности капсулы при растворении карбоната кальция. Последующая адсорбция слоя ТК на якорный слой приводила к окрашиванию суспензии капсул в сине-зелёный цвет, интенсивность которого постепенно увеличивалась по мере появления новых слоёв ТК в оболочке. Наблюдаемое изменение цвета, характерное исключительно для исследуемой комбинации макромолекул, может быть вызвано окислением ТК атмосферным кислородом, происходящим при  $\text{pH} > 7$ .<sup>16</sup>

С целью исследования природы межмолекулярных взаимодействий в мультислойном комплексе белок/полифенол значение  $\text{pH}$  в дисперсионной среде измерялось на каждом шаге наращивания плёнки на поверхности  $\text{CaCO}_3$  (Рисунок 14). В супернатанте, образовавшемся после соосаждения БСА, значение  $\text{pH}$  поднялось к  $\sim 10$  (Рисунок 14), вероятно, за счёт относительно высокой концентрации насыщения карбоната натрия. В результате последующей промывки микрочастиц водой  $\text{pH}$  существенно понижался, оставаясь слегка щелочным ( $\text{pH}$  7.5). Так как это значение  $\text{pH}$  лежит выше изоэлектрической точки БСА, то поверхностный заряд частиц должен оставаться отрицательным. После помещения частиц в раствор п-L-Ар (2 мг/мл,  $\text{pH}$  5.5) основность в дисперсионной среде опять существенно возрастала, почти достигая  $\text{pH}$  10. Причиной наблюдаемого

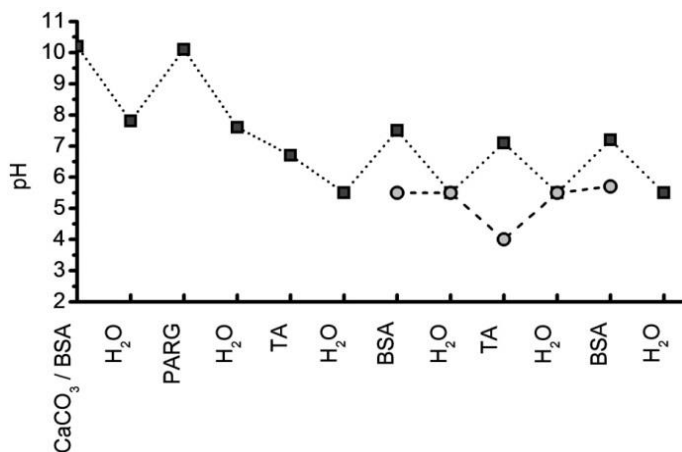
---

<sup>15</sup>Liu M. et al. Monitoring and estimation of the kinetics parameters in the binding process of tannic acid to bovine serum albumin with electrochemical quartz crystal impedance system. // J. Agric. Food Chem. 2006. Vol. 54, № 12. P. 4087–4094.

<sup>16</sup>Erel-Unal I., Sukhishvili S.A. Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol // Macromolecules. 2008. Vol. 41, № 11. P. 3962–3970.



зашелачивания среды при связывании п-L-Ар может служить комплексообразование  $\text{Ca}^{2+}$  его гуанидиновыми концевыми группами,<sup>17</sup> сопровождающаяся частичным растворением карбоната кальция и высвобождением карбоната натрия. Промывка частиц водой вновь



**Рисунок 14.** pH дисперсионной среды в процессе наращивания плёнки белок/полифенол на поверхности частиц  $\text{CaCO}_3$ /BSA-ТРИТЦ (·■··), микрочастиц подсолнечного масла, содержащего ТГКП (--○--). [2]

возвращала pH в слабощелочную область (pH 7.5). При помещении частиц ( $\text{CaCO}_3$ /BSA-ТРИТЦ)/п-L-Ар в раствор ТК (3 мг/мл) с относительно высокой изначальной кислотностью (pH 3), основность дисперсионной среды вырастала до pH~7. Низкий pH раствора ТК, очень слабой кислоты ( $pK_a \sim 8.5$ ), возможно, является следствием естественной высокой кислотности танинового экстракта<sup>18</sup> и гидролиза таниновой кислоты с образованием галловой кислоты,<sup>19</sup> при этом причиной увеличения pH дисперсионной среды с 3 до 7 может служить частичное растворение  $\text{CaCO}_3$  и комплексообразование катионов  $\text{Ca}^{2+}$  таниновой кислотой или продуктами её гидролиза. Комплексы танинов с катионами металлов нерастворимы в воде и могут сосуществовать в образце с капсулами на темплатах. При дальнейшем наращивании плёнки pH дисперсионной среды менялся циклически: промывка частиц водой понижала значение pH до ~5.5, а при их помещении в растворы БСА (2 мг/мл) или ТК (3 мг/мл) происходило возрастание pH до ~7 (Рисунок 14). Обобщив сведения, имеющиеся в литературе об образовании комплексов белок/полифенол, а также учитывая  $pK_a$  ТК (~8.5) и результат измерений pH дисперсионной среды при наращивании плёнки, показанный на Рисунке 14, можно предположить, что основным видом межмолекулярных взаимодействий в мультислойной плёнке БСА/ТК являются водородные связи,

<sup>17</sup>Garnier A., Tosi L. Cu(II)-poly(L-arginine) complexes. Potentiometric and spectral characterization of amine and peptide nitrogen ligands // Biopolymers. 1975. Vol. 14, № 11. P. 2247–2262.

<sup>18</sup>McDonald M., Mila I., Scalbert A. Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation // J. Agric. Food Chem. 1996. Vol. 44, № 2. P. 599–606.

<sup>19</sup>South P.K., Miller D.D. Iron binding by tannic acid: Effects of selected ligands // Food Chem. 1998. Vol. 63, № 2. P. 167–172.



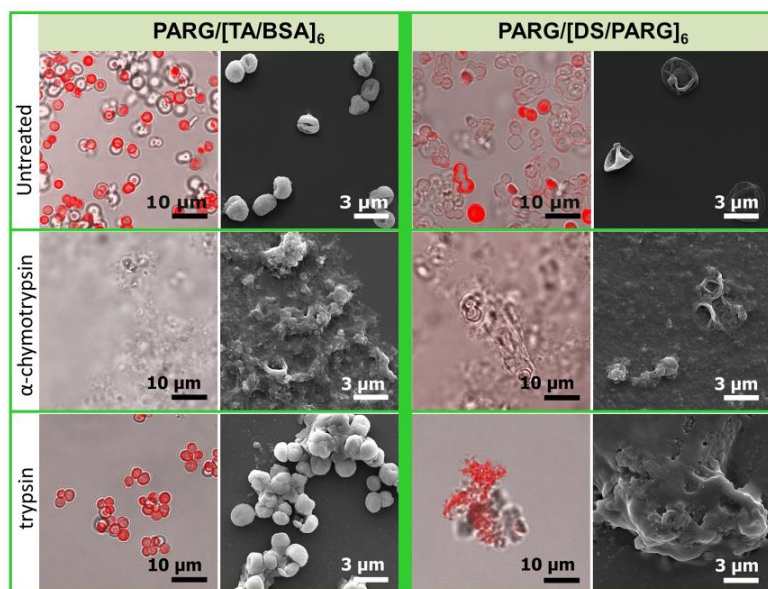
исключая тем самым вклад электростатики. В момент растворения  $\text{CaCO}_3$  при добавлении ЭДТА происходило резкое высвобождение окрашенного комплекса, однако цвет осадка, содержащего капсулы п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub>, всё равно оставался значительно темнее цвета осадка в суспензии капсул п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub>.

Полученные капсулы п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> и п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub> были обработаны двумя протеазами –  $\alpha$ -химотрипсином и трипсином, которые специфически катализируют гидролиз белков по определенным точкам, с целью исследовать возможность контролируемой энзиматической дегградации и высвобождения содержимого. Микрофотографии капсул п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> и п-L-Ар/[ДекС/ п-L-Ар]<sub>6</sub> из свежих образцов показаны в верхней секции Рисунка 15. Результаты свидетельствуют об успешной сборке капсул типа белок/полифенол; важно, что согласно СЭМ капсулы этого типа оказались существенно плотнее, чем п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub>, не коллапсируя при высушивании на твердой подложке и при других манипуляциях, необходимых для подготовки образцов к визуализации при помощи СЭМ. Исследование капсул методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии подтвердило отсутствие в них кальция, т.е. наблюдаемая устойчивость к деформациям действительно является характерным физическим свойством этой композиции, а не проявлением неполного удаления темплата.

Микрофотографии капсул, полученные с помощью КЛСМ и СЭМ, свидетельствуют о чувствительности обеих композиций к  $\alpha$ -химотрипсину: обработка капсул этим энзимом в течение 10 часов приводила к их полной дегградации (Рисунок 15, средняя секция). Красное свечение инкапсулированного БСА-ТРИТЦ на соответствующих микрофотографиях КЛСМ не наблюдается, что скорее всего является следствием высвобождения белка из разрушенных капсул и его последующего расщепления  $\alpha$ -химотрипсином. Тщательное исследование ряда аликвот образца, обработанного  $\alpha$ -химотрипсином, показало наличие незначительного количества целых капсул. Наблюдаемый факт может быть следствием старения активного центра энзима, происходящего быстрее, чем за 10 часов (период обработки). Другой гипотезой является изначальное нахождение этих капсул внутри небольших агрегатов, вследствие чего они оказались облепленными недеградирруемыми остатками своих соседей (например, молекулами или фрагментами молекул ТК) и, в силу этого, недоступными для молекул энзима.

Важно заметить, что капсулы типа белок/полифенол проявляли чувствительность к  $\alpha$ -химотрипсину только в случае, если их внешний слой был образован субстратом энзима – молекулами белка. Возможным объяснением этому служит либо достаточно высокая плотность слоя, образуемого молекулами полифенола, так что энзиму не удается обнаружить и связаться с субстратом, либо то, что молекулы энзима осаждаются на внешнем слое ТК и деактивируются.

Действительно, смешивание растворов ТК и  $\alpha$ -химотрипсина в модельном эксперименте приводило к помутнению и выпадению осадка, что свидетельствует об образовании комплекса ТК/ $\alpha$ -химотрипсин.



**Рисунок 15.** Капсулы  $p$ -L- $Ap/[TK/BSA]_6$  и  $p$ -L- $Ap/[ДекС/p$ -L- $Ap]_6$  (характерные изображения КЛСМ (слева) и СЭМ (справа)):

*верхняя секция* – необработанные капсулы.

Капсулы после 10-ти часовой обработки энзимами:

*средняя секция* –  $\alpha$ -химотрипсином;  
*нижняя секция* – трипсином. [2]

Целостность структуры капсул  $p$ -L- $Ap/[TK/BSA]_6$  и интенсивность свечения загруженного БСА-ТРИТЦ не были нарушены в процессе их обработки трипсином, как можно видеть на микрофотографии КЛСМ (Рисунок 15, нижняя секция слева). Единственным негативным последствием пребывания капсул в растворе трипсина оказалась небольшая агрегация частиц, причиной которой, однако, может быть не столько присутствующий энзим, сколько реакция капсулы на повышенную температуру. Так, агрегаты капсул  $p$ -L- $Ap/[TK/BSA]_6$  были замечены даже в чистой воде после 10 часов инкубации при 37 °С. СЭМ также подтверждает целостность структуры капсул  $p$ -L- $Ap/[TK/BSA]_6$  и отсутствие у них чувствительности к трипсину. И в этом случае видимое присутствие небольшого количества разрушенных капсул скорее является результатом воздействия температуры, чем активности энзима. Анализ ряда проб из образца не выявил существенных расхождений с результатами на Рисунке 15. Наблюдаемое свойство селективной чувствительности капсул белок/полифенол к исследованным протеолитическим энзимам вероятнее всего является результатом высокой специфичности трипсина по отношению к субстрату, т.е. его избирательной способности гидролизовать пептидные связи, расположенные после положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина и лизина, общее количество которых в структуре БСА относительно мало (~16%).<sup>20</sup> Вероятным является и то, что

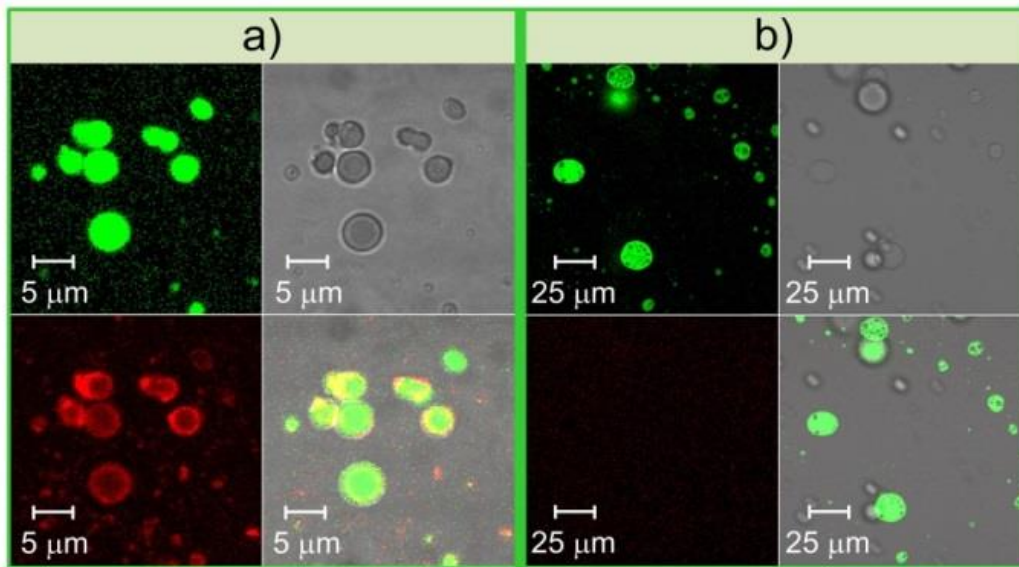
<sup>20</sup>Stein W.H., Moore S. Amino acid composition of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin. // J. Biol. Chem. 1949. Vol. 178, № 1. P. 79–91.

конформационная особенность сегрегации гидрофильных и гидрофобных групп в супрамолекулярном комплексе БСА/ТК делает аминокислотные остатки лизина и аргинина недоступными для трипсина. Что касается  $\alpha$ -химотрипсина, обладающего неспецифической активностью, но преимущественно расщепляющего белки после остатков ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана (и с меньшей скоростью – лейцина, валина, аспарагина и метионина), то его способность деградировать капсулы белок/полифенол понятна, так как общее содержание остатков этих аминокислот в молекуле БСА составляет ~37%.<sup>20</sup>

На данном этапе исследования один якорный слой полипептида абсолютно необходим для получения стабильных капсул типа белок/полифенол. Однако уже при этом общая стоимость материалов капсулы п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> уменьшилась почти в 7 раз по сравнению с п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub> согласно прайс-листу Sigma-Aldrich. Таким образом, полученные в работе капсулы имеют хорошие перспективы для применения в продуктах питания и косметике, где нежелательно использовать дорогостоящие материалы.

#### *Инкапсулирование водонерастворимых соединений*

Частицы дисперсной фазы эмульсии подсолнечного масла с растворённым в нем ТГКП и стабилизированные БСА-ТРИТЦ обладали отрицательной плотностью поверхностного заряда ( $\zeta$ -потенциал –  $(-18 \pm 2)$  мВ). Это даёт основание предположить, что уровень рН дисперсионной среды находится выше изоэлектрической точки БСА (рН 4.7). В соответствии с этим, рН дисперсионной среды был зарегистрирован на уровне 5.5 (Рисунок 14). При помещении частиц в раствор ТК для адсорбции последующего слоя кислотность дисперсионной среды понижалась до рН 4, хотя  $\zeta$ -потенциал почти не изменялся ( $(-16 \pm 3)$  мВ). Следует заметить, что при наращивании капсул белок/полифенол на дисперсной фазе эмульсии типа масло-в-воде значение рН дисперсионной среды было существенно ниже, чем при использовании частиц СаСО<sub>3</sub>. Это подтверждает высказанное ранее предположение о том, что высокощелочной рН, наблюдавшийся на начальной стадии процесса наращивания капсулы на частицах фатерита, является результатом частичного растворения СаСО<sub>3</sub> при связывании катионов Са<sup>2+</sup> молекулами ТК с образованием карбоната натрия. При формировании следующего слоя из молекул БСА  $\zeta$ -потенциал становился более отрицательным –  $(-30 \pm 2)$  мВ, а значение рН возрастало до 5.7. Отрицательные значения  $\zeta$ -потенциала при наращивании капсулы белок/полифенол на дисперсной фазе эмульсии также позволяют исключить вклад электростатических сил в образование поверхностного комплекса и с большей уверенностью предположить комплексообразование за счёт водородных связей.



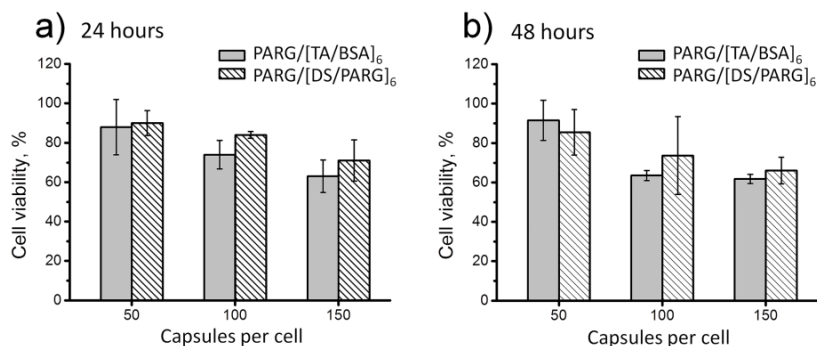
**Рисунок 16.** Капсулы БСА-ТРИТЦ/ТК/БСА, содержащие ТГКП (КЛСМ). Капсулы до (а) и после (b) обработки  $\alpha$ -химотрипсином в течение 10 часов. В каждом из паттернов а) и b): вверху слева  $\lambda_{exc} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 525$  нм; внизу слева  $\lambda_{exc} = 529$  нм,  $\lambda_{em} = 596$  нм; вверху справа – изображение в режиме проходящего света внизу справа – наложение флуоресцентных изображений и изображения в режиме проходящего света. [2]

Кривая распределения по размерам, полученная для капсул типа белок/полифенол, содержащих ТГКП, обладала относительно большой полушириной с максимумом, соответствующим среднему диаметру ( $3.8 \pm 0.8$ ) мкм. Капсулы, диаметр которых больше 2 мкм, можно легко визуализировать с помощью конфокального микроскопа. Соответствующие микрофотографии капсул БСА-ТРИТЦ/ТК/БСА, загруженных ТГКП, показаны на Рисунке 16а. Легко видеть, что частицы обладают ядром (зелёное свечение ТГКП) и оболочкой (красное свечение эмульгатора БСА-ТРИТЦ). Наложение обоих флуоресцентных и просвечивающего изображений четко показывает, что оболочка находится строго на периферии ядра у всех частиц, подтверждая получение стабильных капсул типа белок/полифенол с водонерастворимым содержимым.

В соответствии с установленным ранее фактом того, что только  $\alpha$ -химотрипсин был способен разрушать капсулы, собранные из молекулярных слоёв ТК и БСА, именно этот фермент использовался для контролируемого высвобождения инкапсулированного масла. Обработка  $\alpha$ -химотрипсином в течение 12 часов привела к разрушению капсул и высвобождению окрашенной смеси. Согласно Рисунку 16b, в обработанных частицах отсутствует оболочка, о чем можно судить по отсутствию красного свечения от БСА-ТРИТЦ. Более того, КЛСМ убедительно свидетельствует об активной коалесценции частиц масла, потерявших стабилизирующую оболочку. Так, размер частиц в образце, обработанном  $\alpha$ -

химотрипсином, оказался примерно в 5 раз больше, чем размер капсул, которые не подвергались воздействию энзима. Так же, как и в случае капсул, загруженных водорастворимым БСА-ТРИТЦ, для появления чувствительности к действию энзима последний молекулярный слой оболочки должен был быть образован молекулами БСА.

#### Цитотоксичность капсул типа белок/полифенол



**Рисунок 17.**

Жизнеспособность клеток линии RAW264.7 в присутствии капсул п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub> и п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> после 24 (а) и 48 (б) часов инкубации. [2]

Влияние капсул типа белок/полифенол на жизнеспособность клеток было исследовано на культуре макрофагов мыши клеточной линии RAW264.7. Данные МТТ-теста, приведенные на Рисунке 17, свидетельствуют о том, что так же, как и капсулы п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub>, капсулы п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> не обладают выраженной токсичностью, если берутся в концентрациях, не превышающей 50 к/к.

#### Исследование влияния присутствия полиолов на морфологию и размер частиц карбоната кальция

Смешивание кальциевого и карбонат-содержащего растворов приводит к осаждению CaCO<sub>3</sub> в одной из трёх полиморфных модификаций – фатерит, кальцит или арагонит. Фатерит, имеющий сферическую форму и пористую внутреннюю структуру, является оптимальным темплатом для получения полимерных мультислойных капсул. Помимо прекрасной биосовместимости, характерной для всех полиморфных модификаций CaCO<sub>3</sub>, необходимо отметить ряд важнейших преимуществ фатерита непосредственно для инкапсулирования: 1) метод соосаждения позволяет осуществлять загрузку капсул БАВ с высокой эффективностью; 2) удаление темплата из капсулы производится при достаточно мягких условиях без использования токсичных химических агентов; 3) при растворении CaCO<sub>3</sub> не создается критического осмотического давления, приводящего к разрыву или деформации капсулы, что особенно важно при работе с биополимерами; 4) CaCO<sub>3</sub> может быть полностью удален из капсулы, в отличие от большинства полимерных темплатов, оставляющих токсичные мономеры в толще мультислойной плёнки.

Несмотря на множество достоинств фатерита, его использование для соосаждения активных веществ и получения капсул, применимых в биологических системах, сопряжено с существенными трудностями. В первую очередь, это формирование частиц узкого диапазона размеров – требование, императивное для биомедицинских задач. Вдобавок, использование фатерита пока что не дает возможности получать капсулы в нано-диапазоне: метод соосаждения позволяет получать частицы размером от 2 до 15 мкм, причём наилучшая воспроизводимость и наиболее узкое распределение по размерам были достигнуты для частиц в 4-6 мкм.<sup>21</sup> Это существенно больше, чем требуется, например, чтобы обеспечить проникновение капсул в опухолевые ткани за счёт эффекта гиперваскуляризации, для чего размер капсул не должен превышать 200 нм.<sup>22</sup> Во-вторых, фатерит является наименее термодинамически стабильной полиморфной модификацией  $\text{CaCO}_3$ , в связи с чем необходимо принимать дополнительные меры, чтобы предотвратить его перекристаллизацию в более стабильные кальцит и арагонит.<sup>23</sup> Таким образом, чтобы реализовать преимущества фатерита и полимерных мультислойных капсул в такой важной области, как наномедицина, следует разработать методику получения и стабилизации частиц субмикронного размера.

При смешивании растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в объёме моментально образуются зародыши частиц  $\text{CaCO}_3$ . Осадок сначала находится в аморфном состоянии, а затем трансформируется в процессе последовательных растворения-рекристаллизации, в результате которых образуется смесь различных полиморфных модификаций  $\text{CaCO}_3$ . Вероятность образования того или иного полиморфа существенно зависит от условий реакции. Что касается фатерита, то его образованию способствуют высокая степень пересыщения раствора, щелочной рН, температура в интервале от 25°C до 45°C, а также различные примеси.<sup>24</sup>

Несмотря на множество имеющихся данных по синтезу частиц фатерита в процессе смешивания кальциевого и карбонат-содержащего растворов, по-прежнему отсутствует систематическое исследование, которое бы позволило контролируемо получать наноразмерные частицы фатерита. В данной работе исследовано влияние полиолов как примесей, способствующих росту и стабилизации фатерита путём варьирования температуры, концентрации солей, а

---

<sup>21</sup>Volodkin D. V. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation. // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 8. P. 3398–3406.

<sup>22</sup>Danhier F., Feron O., Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery // *J. Control. Release*. Elsevier B.V., 2010. Vol. 148, № 2. P. 135–146.

<sup>23</sup>Ostwald W. Studien  ber die Bildung und Umwandlung fester K rper // *Zeitschrift f r Phys. Chemie*. 1897. Vol. 22. P. 289–330.

<sup>24</sup>Ogino T., Suzuki T., Sawada K. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1987. Vol. 51, № 10. P. 2757–2767.

также связанных параметров, обусловленных присутствием полиолов – объёмного содержания примеси, количества спиртовых групп и вязкости. В качестве примесей были выбраны этиленгликоль (ЭГ) и глицерин, молекулы которых имеют соответственно 2 и 3 гидроксильных группы. Выбор полиолов обусловлен тем, что эти соединения легко вымываются водой из пор частиц фатерита, т.е. вероятность их попадания в полимерные мультислойные капсулы крайне незначительна.

Для исследования влияния полиола на размер синтезируемого фатерита эквимольные растворы  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  равного объёма по отдельности смешивали с равными количествами полиола, чтобы достичь желаемой концентрации многоатомного спирта в растворе. Затем равные объёмные части полученных смесей соединяли при активном перемешивании для осаждения  $\text{CaCO}_3$ . Чтобы исключить влияние посторонних факторов, во всех экспериментах использовались одинаковые стеклянные реакторы и одно и то же перемешивающее устройство с фиксированной скоростью перемешивания.

Классическая теория нуклеации и начальных стадий роста кристаллов<sup>25</sup> полагает, что более высокая степень пересыщения раствора соответствует большей скорости нуклеации и меньшему значению критического радиуса нуклеации при одной и той же общей массе осадка. В полном согласии с теорией, в проведенном эксперименте средний диаметр частиц, осаждаемых из растворов солей без примесей, уменьшался по мере увеличения концентрации соли от 0.1 до 1.0 М и оказался соответственно 4.5 мкм и 1.5 мкм на границах исследованного интервала.

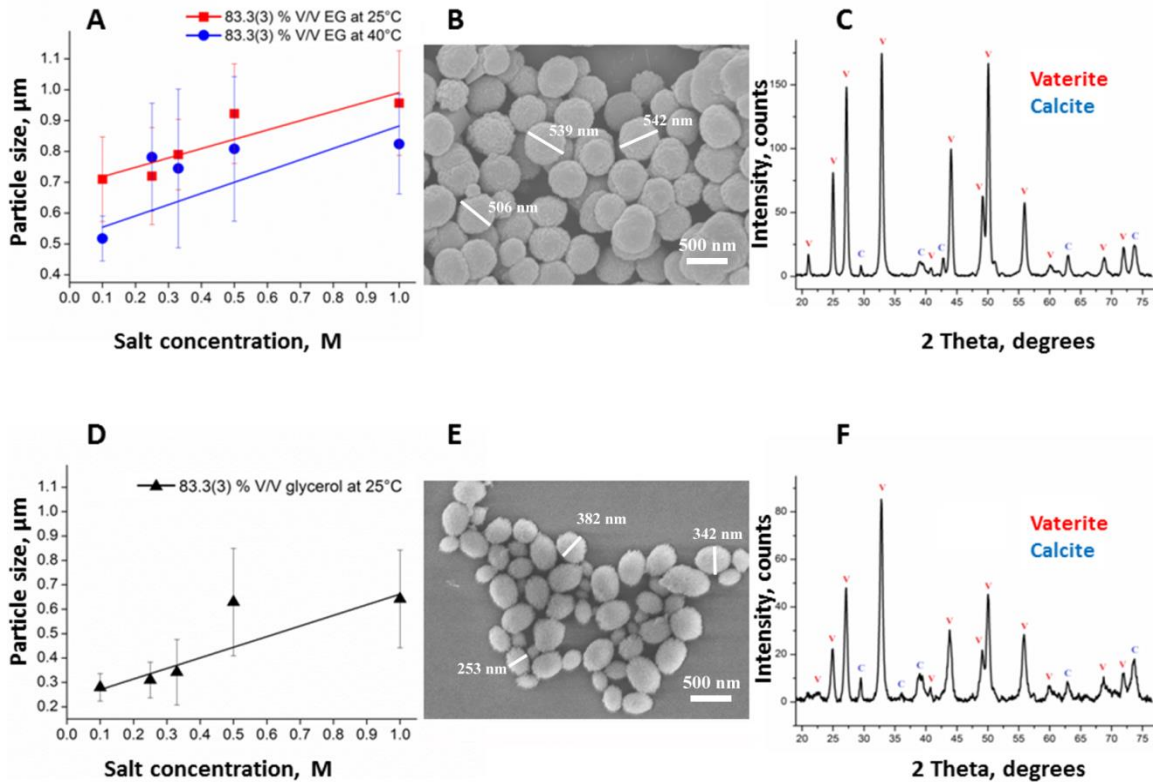
Присутствие полиолов позволило существенно уменьшить размер частиц синтезируемого фатерита, который на этот раз менялся в противоречии с теорией, возрастая по мере увеличения концентрации солей (Рисунок 18). Общий эффект полиолов связан с тем, что их полярные гидроксильные группы взаимодействуют с катионами  $\text{Ca}^{2+}$ , локально увеличивая пересыщение и, соответственно, интенсивность нуклеации, тем самым задавая количество и распределение центров нуклеации в системе. Объяснением наблюдаемой тенденции к увеличению среднего размера частиц при увеличении концентрации соли в присутствии полиолов может служить то, что как только все гидроксильные группы оказываются вовлеченными во взаимодействие с катионами кальция, для оставшихся свободных ионов ассоциация с растущими частицами оказывается энергетически выгоднее участия в образовании новых зародышей кристаллической фазы. Следовательно, повышение концентрации соли при неизменной концентрации полиола в системе приводит к наличию большего количества свободного материала, расходуемого на рост частиц, т.к. общее количество центров

---

<sup>25</sup>Flaten E.M., Seiersten M., Andreassen J.-P. Polymorphism and morphology of calcium carbonate precipitated in mixed solvents of ethylene glycol and water // J. Cryst. Growth. 2009. Vol. 311, № 13. P. 3533–3538.



нуклеации, задаваемое молекулами полиола, остается неизменным. Необходимо отметить, что все частицы в популяциях, синтезированных в присутствии полиолов, представляли собой пористый сферический фатерит, как следует из микрофотографий СЕМ и данных рентгеноструктурного анализа.



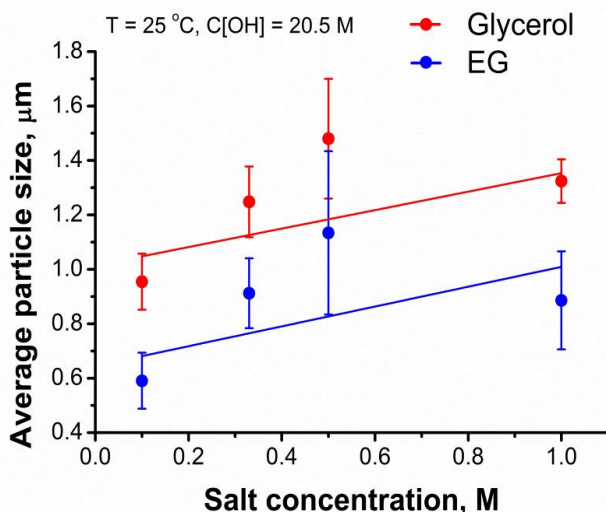
**Рисунок 18.** Физические свойства частиц фатерита, полученных в присутствии полиолов. Средний размер частиц фатерита, как функция концентрации солей в присутствии 83.3(3)% об. полиола: ЭГ, 25°C и 40°C (A); глицерина 25°C (D). Частицы, осаждённые из растворов, содержащих 0.1 М солей и 83.3(3)% об. ЭГ (B) и глицерина (E) (СЭМ). Рентгеновские дифрактограммы показанных на микрофотографиях кристаллов  $\text{CaCO}_3$ , осажденных в присутствии ЭГ (C) и глицерина (F) (“V” и “C” обозначения, показывающие пики характерные для фатерита и кальцита соответственно). [1]

Как хорошо видно из Рисунка 18 (A и D), при одинаковых концентрациях солей глицерин способствует появлению частиц меньшего диаметра, чем ЭГ. Самые маленькие частицы, полученные в присутствии глицерина, имели средний диаметр 350 нм против 500 нм у частиц, синтезированных в присутствии ЭГ. Отмеченная разница может служить результатом влияния двух связанных параметров – количества гидроксильных групп и вязкости. Влияние количества гидроксильных групп на размер фатерита было выявлено с помощью проведения серии синтезов частиц при одинаковых молярных концентрациях полиолов. Результаты эксперимента подтвердили более выраженный эффект глицерина по



сравнению с ЭГ. Одной из комплекса причин полученных данных, вероятно, является 50 % избыток возможных центров нуклеации в растворах глицерина по сравнению с эквимольными растворами ЭГ.

При выводах о влиянии полиолов на размер синтезируемого фатерита необходимо учитывать и вязкость их растворов, которая находится в положительной зависимости от количества гидроксильных групп в молекуле полиола. Так, используемые в работе растворы глицерина обладали значительно большей вязкостью, чем растворы ЭГ одинаковой концентрации. Полагается, что вязкость среды уменьшает подвижность ионов, так что процесс нуклеации оказывается преобладающим над процессом роста частиц.<sup>26</sup> Установить влияние вязкости помогли измерения размера частиц, синтезированных в присутствии ЭГ и глицерина, когда концентрация гидроксильных групп была одинаковой – 20.5 М. Интересно, что большей кинематической вязкостью при этих условиях обладали растворы ЭГ – 6.75 мм<sup>2</sup>/с против 5.99 мм<sup>2</sup>/с у растворов



**Рисунок 19.** Средний диаметр частиц фатерита, как функция концентрации солей при 25 °C и C<sub>[OH]</sub> = 20.5 М в присутствии ЭГ и глицерина. [1]

глицерина, возможно, за счёт меньшей объёмной доли воды в последних. Из Рисунка 19 следует, что вязкость может быть и самостоятельным параметром, способствующим, как и предполагается согласно теории, уменьшению размера синтезируемого фатерита. Так, большая вязкость (в присутствии ЭГ) приводила к образованию меньших частиц.

В отличие от глицерина, чья вязкость значительно уменьшается при нагревании, в смесях ЭГ этот параметр остается неизменным при изменении температуры от 25 до 40 °C, поэтому смеси ЭГ были взяты для того, чтобы судить о влиянии температуры на размер частиц. Серия проделанных экспериментов и

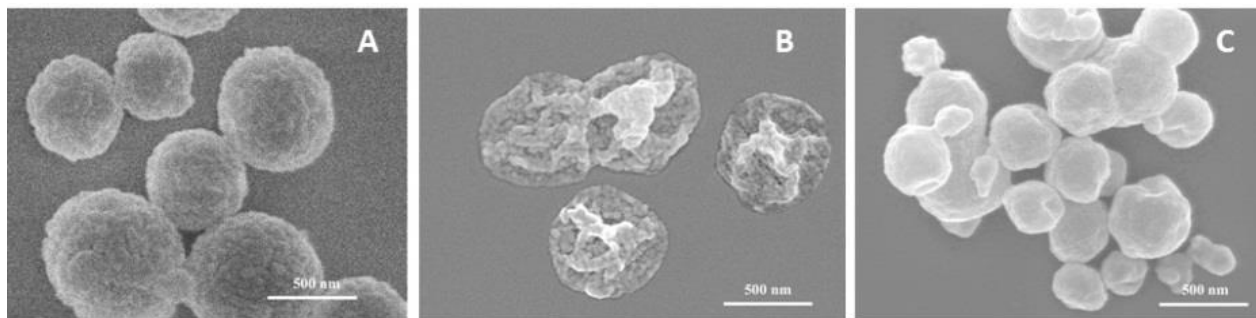
<sup>26</sup> Andreassen J.-P. Growth and aggregation phenomena in precipitation of calcium carbonate. 2001. Vol. 5. P. 1–121.

статистический анализ данных показали, что температура не оказывает существенного эффекта на размер синтезируемого фатерита (Рисунок 18 (А)).

В целом данное исследование позволило выявить условия для получения пористых сферических частиц фатерита диаметром от 350 нм до 4.5 мкм. Самые маленькие частицы были осаждены из смесей, содержащих 83.3(3)% об. глицерина и 0.1 М соли при 25 °С.

### Биодеградируемые капсулы для наномедицины

Условия, позволяющие получать наноразмерные частицы фатерита с наименьшим средним диаметром (83.3(3) % об. глицерина в растворах солей, 25 °С) были использованы, чтобы синтезировать темплат для сборки капсул из пары биополиэлектролитов – п-L-Ар/ДекС. Диаметр частиц в партии составил  $550 \pm 160$  нм (Рисунок 20А).



**Рисунок 20.** Частицы  $\text{CaCO}_3[\text{п-L-Ар/ДекС}]_4\text{п-L-Ар}$  (А), пустые капсулы  $[\text{п-L-Ар/ДекС}]_4\text{п-L-Ар}$  (В), пустые капсулы  $[\text{п-L-Ар/п-L-Ар}]_4\text{п-L-Ар}$  после термообработки при 90°С в течение 1 часа (С) (СЭМ). [1]

На Рисунке 20В представлена микрофотография капсул, содержащих 4.5 двойных полимерных слоя –  $[\text{п-L-Ар/ДекС}]_4\text{п-L-Ар}$ . Капсулы имеют сферическую форму и характерно коллапсируют по типу сдувшегося мяча при высушивании на плоской подложке. Диаметр капсул на микрофотографии составляет ~490 нм.

Как указывалось выше, оптимальный размер частиц, применяемых в наномедицине, не должен превышать 200 нм, то есть по-прежнему актуальной остается разработка методики, позволяющей дальнейшее уменьшение размера полученных капсул. В группе Г. Сухорукова было ранее установлено, что нагревание капсул до определенной температуры приводит к их необратимому уплотнению и сжатию за счёт увеличения подвижности полимерных цепей,<sup>27</sup> причём наблюдаемый эффект зависит от используемой полимерной композиции,

<sup>27</sup>Köhler K., Sukhorukov G.B. Heat Treatment of Polyelectrolyte Multilayer Capsules: A Versatile Method for Encapsulation // Adv. Funct. Mater. 2007. Vol. 17, № 13. P. 2053–2061.

количества полимерных слоёв, а так же от ионной силы дисперсионной среды. Учитывая это, в данной работе сначала были определены оптимальные условия термообработки капсул, варьируя такие параметры, как температура, толщина капсулы, концентрация одновалентного электролита и длительность термообработки. Затем полученные наноразмерные капсулы [п-L-Ар/ДекС]<sub>4</sub> п-L-Ар были подвергнуты термообработке в оптимальных условиях (90 °С в течение 1 часа в бессолевом растворе) и визуализированы с помощью СЭМ (Рисунок 20С). Сравнение капсул до и после термообработки (Рисунок 20В и С) показывает значительное изменение их толщины и размера. Обработанные капсулы сохраняют шарообразную форму и не коллапсируют при высушивании на подложке. Более того, в данном режиме наблюдается их усадка, выражающаяся в значительном уменьшении линейного размера. Так, обработанные капсулы оказались практически в два раза меньше, чем необработанные со средним диаметром 280±90 нм. Согласно анализу тематической научной литературы, это минимальный размер для мультислойных капсул, когда-либо собранных из п-L-Ар/ДекС или других биодegradуемых полимерных композиций.

Существенное уплотнение оболочки, сопровождающее термоусадку капсулы, было использовано для помещения в неё низкомолекулярного вещества – родамина 6G (M = 479 г/моль), модельного соединения, имитирующего некоторые противораковые средства, пищевые добавки и фитолечения. Как упоминалось ранее, капсула из полиэлектролитов полностью проницаема для низкомолекулярных веществ, однако уплотнение стенок, вызванное термообработкой, позволило загрузить капсулы родамином 6G с эффективностью ~77%. Молекулы родамина 6G несут положительный электрический заряд, и поскольку внешний слой капсул был образован положительно заряженным п-L-Ар, можно достоверно предположить, что они были инкапсулированы, а не просто адсорбированы на поверхности капсулы.

### **III. Заключение**

Основные результаты работы состоят в следующем:

1. Методика загрузки биологически активных веществ (БАВ) в полимерные мультислойные капсулы была усовершенствована посредством инкапсулирования «молекулярных коктейлей». Предложенный способ позволяет успешно инкапсулировать и доставлять БАВ, чувствительные к повреждающим факторам или условиям окружающей среды. Методика была успешно применена для инкапсулирования:

- а) матричной РНК (мРНК) – трансфекция клеток мРНК, инкапсулированной в самоорганизованные полимерные мультислои, впервые была

продемонстрирована в данной работе. Эффективность и практическая значимость разработанного метода подтверждаются тем, что экспрессия целевых генов наблюдалась только в клетках, в которых мРНК была доставлена в форме инкапсулированного «молекулярного коктейля», содержащего мРНК и ингибитор активности рибонуклеаз.

- b) основного фактора роста фибробластов (FGF2). При этом показано, что доставка FGF2 капсулами, взятыми в концентрации от 5 до 30 капсул на клетку, способствовала увеличению общего числа клеток линии L929 на 10 – 30% по сравнению с доставкой такого же количества белка в свободной форме. Таким образом, использование полимерных мультислойных капсул для доставки FGF2 позволяет снизить общее количество белка, добавляемого в систему для обеспечения одинакового или даже более выраженного биологического эффекта.

2. Разработаны капсулы, способные эффективно предотвращать перекисное окисление масел, обогащённых полиненасыщенными жирными кислотами.

- a) На основе предположения о том, что катионы  $Fe^{2+}$  являются главным фактором, инициирующим перекисное окисление в эмульсионных системах *in vitro*, был выбран механизм антиоксидантной защиты – встраивание в капсулу слоя молекул таниновой кислоты (ТК), способных эффективно связывать катионы переходных металлов.
- b) Наличие слоя молекул ТК в капсуле приводит к экстракции прооксидантов из дисперсионной среды с образованием нерастворимой соли непосредственно в толще полимерной плёнки, предотвращая тем самым их попадание на границу масляной фазы. Убедительным свидетельством тому служит наблюдаемое полное подавление процесса пероксидации в течение 15 дней.
- c) ТК обеспечивает защиту от пероксидации, если концентрация антиоксиданта, включенного в капсулы, больше или равна концентрации катионов железа в дисперсионной среде.
- d) Доказано, что превентивная антиоксидантная защита, обеспечиваемая разработанной капсулой, оказывается существенно более надёжной, чем эффект от витамина Е, действие которого направлено на обрыв цепи реакций уже инициированного процесса пероксидации.

3. Установлен механизм высвобождения макромолекул, несущих заряженные группы, из капсул, стабилизированных электростатическими взаимодействиями:

- a) на примере амфотерных молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) установлено, что диффузия через капсульные мультислои сопровождается адсорбцией молекул полимерной сеткой и её «закупоривания», которое в дальнейшем сдерживает выравнивание концентрации макромолекул снаружи

и внутри капсулы. Причиной «закупоривания» капсулы предположительно является наличие нескомпенсированных электрических зарядов внутри полимерной сетки.

- b) способ инкапсулирования, таким образом, задаёт распределение молекул белка в толще полимерной сетки, что позволяет добиваться замедленного (в случае предварительной загрузки) или ускоренного (в случае последующей загрузки) высвобождения содержимого капсулы.
- c) на основе сравнительных данных о количестве белка, высвобожденного к некоторому моменту времени из двух типов капсул, ДекС/п-L-Ар и АЛГ/п-L-Ар, было отмечено, что толщина капсулы может служить фактором, регулирующим скорость высвобождения макромолекул, причем при определённых условиях возможно установление режима равномерного высвобождения содержимого капсулы (профиль скорости высвобождения имеет нулевой порядок), что особенно важно для биомедицинских применений капсул.

4. Решена задача получения стабильных капсул типа белок/полифенол. При этом:

- a) исследован механизм межмолекулярных взаимодействий в мультислойном комплексе белок/полифенол. Сделан вывод о том, что стабилизация комплекса осуществляется без участия электростатики, предположительно за счёт образования водородных связей.
- b) показана универсальность капсул с учетом физико-химических свойств инкапсулируемых активных веществ, выраженная в возможности инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные соединения (на примере соответственно БСА-ТРИТЦ и флуоресцентного красителя 3,4,9,10-тетра-(гексаоксикарбонил)перилена).
- c) показана селективная чувствительность капсул к действию протеолитических энзимов. Так, капсулы деградируют при обработке  $\alpha$ -химотрипсином, но остаются стабильными под воздействием трипсина.
- d) удалось свести к минимуму использование в капсулах катионного полипептида, что существенно снизило общую стоимость материалов. Даже при необходимости включения в капсулу якорного слоя п-L-Ар, партия капсул п-L-Ар/[ТК/БСА]<sub>6</sub> стоит практически в 7 раз дешевле партии капсул п-L-Ар/[ДекС/п-L-Ар]<sub>6</sub>, аналогичной по содержанию ресуспендированных частиц.

5. Получены биodeградируемые и биосовместимые капсулы, размер которых соответствует применяемому в современной наномедицине. Продемонстрирована способность капсул удерживать низкомолекулярные вещества, модельные соединения для ряда лекарств. Темплатами для капсул послужили наноразмерные частицы фатерита. Синтез частиц проводился согласно протоколу,

оптимизированному в соответствии с установленным в работе влиянием полиолов на размер получаемых кристаллов, которое показало, что:

- a) в присутствии полиолов размер частиц уменьшается с уменьшением концентрации смешиваемых кальций- и карбонат-содержащих солей.
- b) размер частиц находится в обратной зависимости от количества гидроксильных групп в системе.
- c) вязкость является самостоятельным параметром, способствующим уменьшению размера синтезируемого фатерита.
- d) в присутствии полиолов температура не оказывает существенного влияния на размер синтезируемых частиц фатерита.

6. Создана обширная экспериментальная платформа, позволяющая разрабатывать капсулы для биомедицины, функциональных пищевых продуктов и косметических средств, учитывающая особенности структуры и функций БАВ, условия их высвобождения, а также требования, предъявляемые к капсульным системам в конкретных задачах.

#### **IV. Список работ, в которых опубликованы основные положения диссертации**

##### **Научные статьи в ведущих рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК:**

1. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Antipina M.N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // *Cryst. Growth Des.* 2016. Vol. 16, № 3. P. 1311–1319.
2. Lomova M.V., Brichkina A.I., Kiryukhin M.V., Vasina E.N., Pavlov A.M., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Multilayer Capsules of Bovine Serum Albumin and Tannic Acid for Controlled Release by Enzymatic Degradation // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. Vol. 7, № 22. P. 11732–11740.
3. Lomova M.V., Ivanov I.V., German S.V., Meleshko T.K., Pavlov A.M., Inozemtseva O.A., Antipina M.N., Yakimansky A.V., Sukhorukov G.B., Gorin D.A. Composite magnetic microcapsules based on multilayer assembly of ethanol-soluble polyimide brushes and magnetite nanoparticles: preparation and response to magnetic field gradient // *J. Polym. Res.* 2015. Vol. 22, № 10. P. 1-7.
4. Kakran M., Muratani M., Tng W.Q.J., Liang H.Q., Trushina D.B., Sukhorukov G.B., Ng H.H., Antipina M.N. Layered polymeric capsules inhibiting the activity of RNases for intracellular delivery of messenger RNA // *J. Mater. Chem. B.* 2015. Vol. 3, № 28. P. 5842–5848.

5. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Kovalchuk M.V., Antipina M.N. CaCO<sub>3</sub> vaterite microparticles for biomedical and personal care applications // *Mater. Sci. Eng. C*. 2014. Vol. 45. P. 644–658.
6. Kakran M., Antipina M.N. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2014. Vol. 18. P. 47–55.
7. Antipina M.N., Kiryukhin M.V., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B. Micropackaging via layer-by-layer assembly: microcapsules and microchamber arrays // *Int. Mater. Rev.* 2014. Vol. 59, № 4. P. 224–244.
8. Sadovoy A.V., Lomova M.V., Antipina M.N., Braun N.A., Sukhorukov G.B., Kiryukhin M.V. Layer-by-Layer Assembled Multilayer Shells for Encapsulation and Release of Fragrance // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2013. Vol. 5, № 18. P. 8948–8954.
9. Kiryukhin M.V., Gorelik S.R., Man S.M., Subramanian G.S., Antipina M.N., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Individually Addressable Patterned Multilayer Microchambers for Site-Specific Release-On-Demand // *Macromol. Rapid Commun.* 2013. Vol. 34, № 1. P. 87–93.
10. She Z., Wang C.X., Li J., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Encapsulation of basic fibroblast growth factor by polyelectrolyte multilayer microcapsules and its controlled release for enhancing cell proliferation // *Biomacromolecules*. 2012. Vol. 13, № 7. P. 2174–2180.
11. Yakovlev N.L., Kiryukhin M.V., Antipina M.N., Susanto T.T., Ravi S., Adithyavairavan M., Sukhorukov G.B. Secondary Ion Mass Spectrometry of Macromolecules Loading in Individual Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules // *Aust. J. Chem.* 2011. Vol. 64, № 9. P. 1293-1296.
12. Antipina M.N., Sukhorukov G.B. Remote control over guidance and release properties of composite polyelectrolyte based capsules // *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 63, № 9. P. 716–729.
13. Sadovoy A.V., Kiryukhin M.V., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Kinetic stability of water-dispersed oil droplets encapsulated in a polyelectrolyte multilayer shell // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13, № 9. P. 4005-4012.
14. Lomova M.V., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Antioxidant Coating of Micronsize Droplets for Prevention of Lipid Peroxidation in Oil-in-Water Emulsion // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2010. Vol. 2, № 12. P. 3669–3676.
15. De Cock L.J., De Koker, S., De Geest, B.G., Grooten J., Vervaet C., Remon J.P., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. Vol. 49, № 39. P. 6954–6973.

16. She Z., Antipina M.N., Li J., Sukhorukov G.B. Mechanism of protein release from polyelectrolyte multilayer microcapsules // *Biomacromolecules*. 2010. Vol. 11, № 5. P. 1241–1247.
17. Antipina M.N., Schulze I., Heinze M., Dobner B., Langner A., Brezesinski G. Physical-chemical properties and transfection activity of cationic Lipid/DNA complexes // *ChemPhysChem*. 2009. Vol. 10., № 14. P. 2471–2479.
18. Antipina M.N., Kiryukhin M.V., Chong K., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Patterned microcontainers as novel functional elements for microTAS and LOC // *Lab Chip*. 2009. Vol. 9, № 10. P. 1472–1475.
19. Antipina M.N., Dobner B., Konovalov, O.V., Shapovalov V.L., Brezesinski G. Investigation of the Protonation State of Novel Cationic Lipids Designed for Gene Transfection // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, № 49. P. 13845–13850.
20. Antipina M.N., Schulze I., Dobner B., Langner A., Brezesinski G. Physicochemical Investigation of a Lipid with a New Core Structure for Gene Transfection: 2-Amino-3-hexadecyloxy-2-(hexadecyloxymethyl)propan-1-ol // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 7. P. 3919–3926.

### **Монографии**

21. Antipina M.N., Kiryukhin M.V., Sukhorukov G.B. Stimuli-Responsive Polymer Composite Multilayer Microcapsules and Microchamber Arrays in Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2nd Edition / eds. Decher G., Schlenoff J. – Wiley, 2012. Vol. 2, P. 851-891.

### **Международные патенты и патентные заявки**

22. Gastric resistant capsules for delivery of bioactives to small intestine. M. V. Kiryukhin, M. N. Antipina, G. B. Sukhorukov, H. Singh, B. Haigh, N. Roy, M. Novoselova, SG Patent Application 10201508831S.
23. Process for manufacture of a micro-chamber array. M. V. Kiryukhin, A. V. Sadovoy, S. R. Gorelik, S. M. Man, M. N. Antipina, K. Chong, H. Y. Low, G. B. Sukhorukov, PCT Patent Application No. PCT/SG2011/000071.
24. Array of microcapsules for controlled loading of macromolecules, nanoparticles and other nanoscale items and a method of fabricating it. Kiryukhin M., Antipina M., Chong K., Low H. Y., Sukhorukov G. US8343773 B2, Date 2013-01-01.